

**ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
SCHNELLDIAGNOSTIK
BEI VIRUSERKRANKUNGEN DER HAUT**

Helmuth Gräser

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. O. Braun-Falco

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE SCHNELLDIAGNOSTIK

BEI VIRUSERKRANKUNGEN DER HAUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Helmuth Gräser

aus
München

Jahr

1976

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

BERICHTERSTATTER: Privatdozent Dr. H.H. Wolff

MITBERICHTERSTATTER: Professor Dr. O. Braun-Falco

DEKAN: Professor Dr. W. Spann

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 14.12.1976



Inhaltsübersicht

I.	EINLEITUNG	Seite	1
II.	METHODEN DER VIRUSDIAGNOSTIK		2
	1. Klinisches Bild bei Viruserkrankungen der Haut		2
	2. Histologische Untersuchung		3
	3. Tierversuch		5
	4. Viruszüchtung in der Gewebekultur		7
	5. Serologische Methoden		12
	6. Elektronenmikroskopie		21
	a) Dünnschnittechnik		21
	b) Negativkontrastverfahren		23
III.	DAS NEGATIVKONTRASTVERFAHREN		24
	1. Historischer Überblick		24
	2. Theoretische Grundlagen		26
	3. Empfohlene Methoden		35
	4. Ergebnisse früherer Untersuchungen		42
IV.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN ZUR NEGATIVKONTRASTIERUNG BEI VIRUSERKRANKUNGEN DER HAUT		47
	1. Ermittlungen der besten Methodik		47
	a) Sukzessiv- und Simultantechnik		47
	b) Zeitfaktor		52
	c) Einfluß des pH-Wertes		60

2. Haltbarkeit der Kontrastie-	Seite	64
rungslösungen		
3. Haltbarkeit des Untersu-		67
chungsmaterials		
4. Haltbarkeit des Materials		68
in kontrastiertem Zustand		
 V. ERGEBNISSE DER ELEKTRONENMIKRO-		
SKOPISCHEN DIAGNOSTIK		70
 1. Patientengut		70
2. Morphologie der Viren im Ne-		70
gativkontrast		
a) Herpesvirusgruppe		70
b) Pockenvirusgruppe		73
3. Ergebnisse der elektronenmikro-		76
skopischen Untersuchungen		
4. Diskussion der Ergebnisse		77
5. Wie lange sind Viren im Ver-		
lauf der Erkrankung nachzu-		77
weisen?		
 VI. ZUSAMMENFASSUNG		79
 VII. LITERATURVERZEICHNIS		82
 VIII. LEBENSLAUF		97

I. Einleitung

Das Negativkontrastverfahren ist ein seit langem bekanntes Präparationsverfahren der Elektronenmikroskopie (9,24). Es ist technisch einfach und liefert das Ergebnis in kürzester Zeit. Zur Schnelldiagnostik bei Viruserkrankungen der Haut erscheint es besonders geeignet.

Obwohl viele Hautkliniken über ein eigenes elektronenmikroskopisches Labor verfügen oder mit einer elektronenmikroskopischen Abteilung zusammenarbeiten, ist das Negativkontrastverfahren in der dermatologischen Routinediagnostik derzeit wenig gebräuchlich. Eine Ausnahme macht allenfalls die Pockendiagnostik, die freilich in der Praxis bei uns keine Rolle spielt.

Die vorliegende Arbeit soll dazu anregen, die elektronenmikroskopische Schnelldiagnostik im Negativkontrastverfahren bei Viruserkrankungen der Haut in das Spektrum diagnostischer Möglichkeiten einzubeziehen (17,82).

Es wurde versucht, die bekannten Methoden kritisch zu vergleichen, eine für die Routinediagnostik geeignete einfache Methode auszuwählen und den Wert für die Diagnostik in der Praxis festzustellen.

II. Methoden der Virusdiagnostik

1. Klinisches Bild bei Viruserkrankungen der Haut

Bei vielen Viruserkrankungen der Haut ist das klinische Erscheinungsbild so typisch, daß der Erfahrene hieraus eine sichere Diagnose stellen kann. Labormethoden dienen dann lediglich der Bestätigung einer klinisch gestellten Diagnose. Sie sind besonders dann wertvoll, wenn untypische Hauterscheinungen oder Krankheitsverläufe vorliegen.

Für die klinische Diagnostik sind entscheidend die Anamnese, der Verlauf, die Lokalisation und das morphologische Bild der einzelnen Hauteffloreszenzen (29,40).

Beispielsweise schließt eine Windpockenerkrankung in der Kindheit eine Zweiterkrankung weitgehend aus. Für Zoster sind der meist einseitige Sitz von gruppierten Bläschen im Ausbreitungsgebiet eines sensiblen Nerven und die subjektive Schmerzangabe so typisch, daß auf eine labortechnische Absicherung der Diagnose in den meisten Fällen verzichtet werden kann. Andererseits können bei Zoster generalisatus und Varizellen durchaus echte Pocken differentialdiagnostisch in Frage kommen. Diese Differentialdiagnose ist allerdings nur zu erwägen, wenn der Patient innerhalb der Inkubationszeit aus einem Pockengebiet angereist ist, beziehungsweise Kontakt mit einem Erkrankten gehabt haben kann. Für Herpes simplex ist rezidivierender Ver-

lauf typisch, Prädilektionsstellen sind die Lippen und das Genitale.

Die streng epidermotropen Virusarten rufen im allgemeinen charakteristische Veränderungen hervor: plane und vulgäre Warzen, spitze Condylome, Mollusca contagiosa. Diese bekannten Beispiele sollen zeigen, daß bei Viruserkrankungen der Haut immer zuerst die klinische Untersuchung entscheidend ist. Die zusätzlich diagnostisch oft wertvollen Labormethoden werden im folgenden Kapitel übersichtsartig dargestellt.

Das bekannteste Beispiel für den Wert der elektronenoptischen Schnelldiagnostik durch Virusnachweis mit dem Negativkontrastverfahren ist die Abgrenzung zwischen Pocken und Windpocken (22). Wegen der Gefährlichkeit der Pocken und der großen Tragweite der notwendigen Isolierungsmaßnahmen ist die Schnelligkeit der Diagnostik ein besonders wichtiger Faktor.

2. Histologische Untersuchung

Viele Viren, besonders aber die dermatotropen Arten, induzieren im Verlauf der Infektion histomorphologische Veränderungen im Gewebe, die der Sicherung der Diagnose dienen können. Die Viren selbst sind lichtmikroskopisch nicht nachweisbar. Sie können aber in so großen Massen intrazellulär auftreten, daß ihre Kolonien im gefärbten histologischen Präparat als sogenannte

Einschlußkörper erkennbar sind. Einschlußkörper können im Kern oder im Zytoplasma der befallenen Zellen oder in beiden Zellbestandteilen auftreten und ein zwar nicht spezifisches, in vielen Fällen aber ein relativ typisches histologisches Substrat darstellen (29,54).

In diesen Fällen stellen die Viren selbst die Einschlußkörper dar, sie werden auch als spezifische Einschlußkörper bezeichnet (38). Daneben können durch Virusbefall Zellprodukte induziert werden, die als unspezifische Einschlußkörper imponieren. Die Unterscheidung konnte durch die Elektronenmikroskopie von Dünnschnittpräparaten sichergestellt werden (siehe Kapitel II/6a).

Der Virusbefall kann weiter zu den relativ unspezifischen Veränderungen der ballonierenden Degeneration, der retikulären Degeneration, dem Zelltod, zur Bildung von Riesenzellen und zur Einzelzellverhornung führen (29,55). Diese Veränderungen sind für manche Erkrankungen pathognomonisch, wie beispielsweise die Bildung von sogenannten Molluscum-Körperchen für Molluscum contagiosum. Das histologische Übersichtsbild zeigt außerdem in einigen Fällen Stimulation der epidermalen Proliferation mit Entwicklung von Papillomen (zum Beispiel induzieren Warzenviren, die Verruca vulgaris und das Condyloma acuminatum) oder intraepidermale Bläschenbildung (wie beim Herpes simplex, Zoster und Varizellen). Charakteristisch ist auch die Infiltration mit mononukleären Zellen, wobei in den Fällen lo-

kalisierter infiltrativer Prozesse die Rundzellenreaktionen gegenüber den leukozytären Elementen dominieren.

Diese bekannten Beispiele sollen zeigen, daß die histologische Untersuchung bei Viruserkrankungen der Haut in vielen Fällen diagnostisch hilfreich sein kann.

3. Tierversuch

Bei den meisten Virusinfektionen gelingt die Elementarkörperdarstellung besser nach Zwischenschaltung geeigneter Wirte. In den Organen bestimmter Tierarten kommt es zu schneller Vermehrung und gehäuften Ansammlungen von Inclusionen und Elementarkörpern. Vorwiegend werden heute Affen, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Ratten und weiße Mäuse zum Tierversuch herangezogen. Die Übertragung muß je nach Wirt und Tropismus auf verschiedenem Wege vorgenommen werden. Sie kann intrazerebral, intraperitoneal, kutan, korneal, intravenös, subkutan oder nasal erfolgen. Hierbei ist zu beachten, daß bei verschiedenartigen Versuchstieren auch bei gleichem Erreger unterschiedliche Übertragungsmethoden notwendig sein können.

Das Herpes-simplex-Virus läßt sich zum Beispiel sehr gut auf Affen, Kaninchen, Meerschweinchen und weiße Mäuse übertragen. Weniger gut empfindlich sind Pferde, Maulesel, Ziegen, Enten, Hühner, Bussarde, Sperlinge, Schildkröten und Frösche (53).

Die Folgen einer experimentellen Virusinfektion richten sich nach dem Infektionsmodus, nach der Tierart und den Stammeigenschaften der zur Inokulation benutzten Virusart. Meist bilden sich Veränderungen an der Eintrittspforte aus, verschiedentlich werden auch davon entfernt liegende Organe betroffen.

Die beiden wichtigsten tierexperimentellen Nachweismethoden für das Herpes-simplex-Virus sind der 'GRÜTER'sche Kornealversuch (18) und die intraperitoneale Infektion von neugeborenen Mäusen. Beim Kornealversuch erfolgt die Übertragung des infektiösen Materials durch Skarifikation oder Gitterimpfung, wonach im positiven Fall nach 2-5 Tagen das klinische Bild der Keratitis dendritica zu beobachten ist. Vom enukleierten Auge können dann Abklatschpräparate, histologische Präparate zum Nachweis von eosinophilen Kerneinschlüssen oder elektronenmikroskopische Tupfpräparate für das Negativkontrastverfahren hergestellt werden. Auch Meerschweinchen, Ratten und weiße Mäuse können korneal mit dem Herpes-simplex-Virus beimpft werden, doch ist die Zuverlässigkeit nicht so groß wie beim Kaninchen. Ebenfalls gut zur Isolierung des Herpes-simplex-Virus eignen sich neugeborene weiße Mäuse. Sie werden nach 1-3 Tagen intraperitoneal beimpft, der Tod tritt nach 3-5 Tagen ein. Methodische Erläuterungen dazu findet man bei BESWICK (5,6).

Obwohl die meisten dermatotropen Virusarten auf Versuchstiere übertragen werden können, verhalten sich doch einige wenige völlig refraktär. So konnte zum Beispiel das Varizellen-Zostervirus trotz vieler Versuche bisher nicht auf Laboratoriumstiere übertragen und weitergezüchtet werden.

4. Viruszüchtung in der Gewebekultur

Einige wenige Virusarten können nicht auf Laboratoriumstiere übertragen werden. Die Züchtung der Viren im Brutei und die Gewebekultur haben daher die Möglichkeiten der Virusisolierung wesentlich verbessert. Besonders durch die Gewebekultur konnten die durch die natürliche Resistenz vieler Tierarten begrenzten Möglichkeiten der Erregerisolierung stark erweitert werden.

Die Organe und Eihäute des Hühnerembryos sind gegenüber zahlreichen Virusinfektionen sehr empfindlich. Die Beimpfung der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier ist heute eine Standardmethode der Viruszüchtung. Daneben ist die Beimpfung der Amnion- oder Allantoishöhle möglich, bei manchen Virusarten auch die Züchtung im Dottersack. Die ersten Zeichen der Virusvermehrung im Brutei sind makroskopisch erkennbare Herde, welche isoliert oder konfluierend in Form von Plaques auftreten. Form, Größe, Farbe und Konsistenz sind für manche Virusarten charakteristisch,

doch reichen diese makromorphologischen Details nicht immer zur Diagnose aus. Um ein genaues Bild über Art und Ausmaß der Infektion zu erhalten, können dann Ausstrichpräparate oder Schnitte von der Chorionallantoismembran zur lichtoptischen Darstellung der virusspezifischen Einschlußkörper angefertigt werden. Auch elektronenoptische Direktpräparate und Ultradünnschnitte sind möglich.

Das Varizellen-Zostervirus läßt sich nicht im Brutei züchten. Es ließ sich bisher nur mit Hilfe zusätzlicher Gewebe auf der Chorionallantoismembran überlebend halten.

Das Herpes-simplex-Virus hingegen vermehrt sich vorzüglich im Brutei. DAWSON (15) berichtete als einer der ersten Autoren über Züchtungen dieser Art. Das Bruteiverfahren ist heute die Standardmethode für die Isolierung des Herpes-simplex-Virus. Es ist in der Empfindlichkeit dem Kornealversuch überlegen. Auch die Inoculation des Dottersackes ist möglich, doch liefert sie nicht so gute Ergebnisse wie Chorionallantoismembranbeimpfung. Die Züchtung des Herpes-simplex-Virus in fortlaufenden Eipassagen gelingt ohne Schwierigkeiten, ebenso Wechsellpassagen vom Brutei zum Tier und umgekehrt.

Das makroskopische Bild der Herpes-simplex- Virusplaques allein reicht für die Diagnose nicht aus, da die Ähnlichkeit mit Vaccineherden Anlaß zu Verwechs-

lungen geben kann. In einem solchen Fall stehen zur Differentialdiagnostik histologische und serologische Methoden zur Verfügung. Absolut sicheren Aufschluß liefert die elektronenmikroskopische Darstellung der Virusteilchen. Hierzu werden die Läsionen der infizierten Membran in Form von Dünnschnitten für die elektronenoptische Analyse präpariert.

Die einfache Möglichkeit der Erregerzüchtung im Brutei hat die virologische Diagnostik wesentlich verbessert. Ebenso konnten durch die unproblematische Weiterzüchtung viele Untersuchungen vorgenommen werden, die neue Erkenntnisse über Morphologie, Entwicklung und Verhalten der Viren lieferten.

Nicht alle Viren sind jedoch in Eikulturen züchtbar. Vielfach ist es aber möglich, diese Erreger in der Gewebekultur zur Vermehrung zu bringen.

Gewöhnlich werden Epithel- und Fibroblasten-Reinkulturen angelegt, da sie besonders empfindlich für Virusinfekte sind. Als Ausgangsmaterial eignen sich besonders Explantate der Kaninchenkornea, Nierenepithel vom Kaninchen, Affen und Menschen. Explantate vom Herzmuskel und Skelettmuskulatur des Hühnerembryos liefern Fibroblastenkulturen.

Die Ansprüche, die die einzelnen Virusarten an das Nährmedium stellen, sind sehr unterschiedlich (75). Einige Virusarten können nur in stark empfindlichen Zellsystemen wie Kükenkornea-Gewebekulturen oder Affennierenepithelkulturen zur Vermehrung gebracht werden. Einige wenige Arten lassen sich nur in menschlichen Zellkulturen züchten.

Den stärksten Impuls erhielt die Gewebezüchtung für Zwecke der Virologie deshalb durch die Möglichkeiten der Kultur menschlicher Zellen. Zur Herstellung von Gewebeexplantaten eignen sich die menschliche Epidermis, sogenannte Langzeitkulturen (63), menschliches Amnion- oder Nierenepithelgewebe und besonders der He-La-Zellstamm, der von einem Cervix-Carcinom gewonnen und in Passagen fortgeführt wurde (68).

Nicht alle Zellsysteme des Menschen liefern gleich gute Vermehrungsbedingungen für ein Virus. Besonders hohe Anforderungen an das Medium stellt das Varizellen-Zostervirus. Es vermehrt sich fast nur in menschlichen Gewebekulturen. WELLER (77) gelang die Züchtung in Hautkulturen menschlicher Embryos und in Zellen des Präputiums. Auch in Zellkulturen aus Affennierenepithel und menschlichen Amnionzellen kann es zur Vermehrung gebracht werden (72).

Weitaus besser vermehrt sich das Herpes-simplex-Virus in der Gewebekultur. Die ersten Versuche dazu unternahmen PARKER und NYE im Jahre 1925, wobei sie Kaninchenhodenkulturen verwendeten. Besonders gut zur Züchtung des Herpes-simplex-Virus eignen sich He-La-Zellkulturen, Kulturen aus menschlichen Embryonalzellen, menschliche Amnionzellen und Kulturen aus menschlichen Konjunktivalepithel (23). Außer in menschlichen Kulturen kann es auch im Gewebe von Mäuseembryonen, Kaninchenkorneagewebe und zahlreichen anderen Tiergewebekulturen zur Ansiedlung und Vermehrung gebracht werden.

Ein schon makroskopischer Anhaltspunkt für den Erfolg der Beimpfung ist der zytopathogene Effekt. Er äußert sich im Falle der Varizellen-Zosterinfektion durch die Ausbildung von scharf begrenzten Läsionen, die etwa eine Woche nach der Beimpfung in dem Zellrasen auftreten. Die mikroskopische Untersuchung zeigt, daß die Zellen in den Herden zum Teil erheblich vergrößert sind und Kerneinschlüsse aufweisen. Außerdem treten Riesenzellen mit multiplen Kerneinschlüssen auf. Die Zellen degenerieren und zerfallen schließlich.

Ebenso wie das Varizellen-Zostervirus erzeugt das Herpes-simplex-Virus einen zytopathogenen Effekt, der auch makroskopisch, besser aber mit dem Mikroskop beurteilt werden kann. Zur Sicherung des Virusnachweises reicht der zytopathogene Effekt allein nicht aus. Es können nun aber bei der Gewebekultur alle die Nachweis-

methoden herangezogen werden, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden.

5. Serologische Methoden

Der direkte Erregernachweis in der Gewebekultur oder mit Hilfe von Laboratoriumstieren wird in zunehmendem Maße von der virusserologischen Diagnostik verdrängt. Die Gründe sind die häufig schwierige, immer sehr zeitraubende Isolierung im Laboratorium, daneben auch die wesentlich geringere Spezifität im Vergleich zur serologischen Diagnostik.

Die krankheitserregenden Viren wirken auf das Immunsystem des Körpers als Antigene. Der Organismus, der sich mit einem Krankheitserreger auseinandersetzen hat, produziert gegen ihn gerichtete Antikörper, die eine vollständige oder Teilimmunisierung zur Folge haben. Antikörper sind streng spezifisch wirksame Proteine, die nur mit dem entsprechenden Antigen reagieren. Diese spezifische Antigen-Antikörperreaktion bildet die Grundlage aller serologischen Nachweismethoden, da sie in verschiedener Art und Weise der Beobachtung zugänglich, sowie qualitativ und quantitativ ausgewertet werden kann und dadurch in der Lage ist, zuverlässige Aussagen über Art und Verlauf einer Erkrankung zu liefern.

Virusserologische Standardmethoden sind Präzipitations-, Agglutinations- und Komplementbindungsreaktion, der Neutralisationstest, Widaagglutinations-
hemmungsreaktion und die Immunfluoreszenztechnik.

Die einfachsten serologischen Reaktionen sind solche, die zur Aggregats- oder Komplexbildung führen, wobei entweder eine Ausfällung (Präzipitation) oder Zusammenballung (Agglutination) eintreten kann.

Die Präzipitation wurde im Jahre 1897 von KRAUS in Wien entdeckt, als er das Filtrat einer Typhusbouillonkultur mit Typhusantiserum vermischte. Zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperreaktion sind drei Wege möglich: das Flockungsverfahren, das Überschichtungsverfahren und die Präzipitation im Agargel.

Das Flockungsverfahren wird vor allem dann angewandt, wenn es gilt, quantitative Aussagen zu machen. Aus dem Verhältnis Antigen-Antiserum kann direkt auf die Antikörperkonzentration geschlossen werden. Beim Überschichtungsverfahren werden in kleinen Röhrchen Testseren mit Antigenlösungen überschichtet, wodurch es im positiven Fall zur Ausbildung eines Präzipitationsringes kommt. Beim Agargelverfahren läßt man Antigen und Antiserum im Gel gegeneinander diffundieren, wobei es an den Stellen geeigneter Antigen-Antikörperkonzentration zur Ausfällung kommt.

Die Agglutination wurde von GRUBER im Jahre 1896 entdeckt, als er durch Vermischen eines entsprechenden Immunserums mit einer Bakterienlösung deren Verklumpen beobachtete. Der Vorteil gegenüber der Präzipitation liegt darin, daß größere Antigenmengen verwendet werden können, wodurch die Ausflockung leichter zu beobachten ist. Kleinere Viren liefern keine sichtbare Agglutination, da die Masse der Partikel zu gering ist, um sichtbar zu werden. Das Agglutinationsverfahren eignet sich vor allem zur Diagnostik der Rickettsiosen (34).

Die Komplementbindungsreaktion wurde im Jahre 1901 von BORDET und GENGOU angegeben. Ihre Ausführung entspricht in den technischen Bedingungen weitgehend der WASSERMANN'schen Reaktion. Diese von WASSERMANN, NEISSER und BRUCK im Jahre 1906 angegebene serologische Syphilisreaktion ist die bekannteste Komplementbindungsreaktion. Zum Erregernachweis sind zwei Systeme notwendig: das bakterielle System, das sich aus Antigen, Antikörper und Komplement zusammensetzt und das hämolytische System ohne Komplement. Das hämolytische System dient als Indikator.

Zunächst werden Antigen, Patientenserum und Komplement zusammengebracht. Das Patientenserum muß vorher inaktiviert werden, damit das im menschlichen Serum vorhandene Komplement nicht verfälschend auf die Reaktion

einwirken kann. Davon getrennt werden Antigen und Antikörper des hämolytischen Systems vermischt.

Sind im Patientenserum die gesuchten Antikörper vorhanden, wird das verfügbare Komplement durch die Antigen-Antikörperreaktion verbraucht. Das nachträglich zugesetzte hämolytische System findet kein freies Komplement vor, es kommt nicht zur Hämolyse. Fehlt dagegen im Patientenserum der Antikörper, so bleibt das Komplement verfügbar. Es kann dann im hämolytischen System die Hämolyse auslösen. Das Fehlen der Hämolyse zeigt also an, daß der gesuchte Antikörper im Krankenserum vorhanden war. Hämolyse bedeutet dagegen einen negativen Ausfall (40).

Die Komplementbindungsreaktion ist weitaus empfindlicher als Präzipitation und Agglutination. Sie wird zur Diagnostik zahlreicher Viroser herangezogen, doch muß auch mit dem Vorkommen unspezifischer Inhibitoren gerechnet werden. Sie können einen negativen Reaktionsausfall trotz sicherer Infektion bedingen. MELNIK und BANKER (42) konnten allerdings zeigen, daß die Anzahl der aus diesem Grunde nicht erfaßbaren Seren gering ist.

Auch der Neutralisationstest beruht auf der Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion. Danach wird die Virusaktivität neutralisiert, wenn im Serum des Patienten Antikörper sind, die dem Virusantigen homolog sind. Das Kriterium für die Beurteilung einer Erkran-

kung ist dabei die Grenze, bei der diese neutralisierende Wirkung gerade noch stattfindet. Der Neutralisationstest kann im Tierversuch, auf der Chorionallantoismembran von Bruteiern oder mit Hilfe von Gewebekulturen vorgenommen werden. Im ersten Fall ist der Exitus der Tiere, im zweiten das Absterben des Hühnerembryos und Herdbildung auf den Membranen und im letzten Fall der zytopathogene Effekt das Kriterium für die Erkrankung. Die größte Spezifität erreicht der Neutralisationstest in der Gewebekultur. Spezielle Erläuterungen dazu finden sich bei LIPPELT (35).

Der Hämagglutinationstest beruht auf der Tatsache, daß zahlreiche Virusarten über sogenannte Hämagglutinine verfügen, die die Erythrozyten einer oder mehrerer Tierarten zu agglutinieren vermögen. Entdeckt wurde dieses Phänomen gleichzeitig von HIRST, Mc CLELLAND und HARE im Jahre 1941.

Der Vorgang verläuft in zwei Schritten, die zeitlich aufeinander folgen. Zuerst kommt es zur Adsorption des Virus an die Erythrozytenoberfläche, eine Bindung, die sich im Phänomen der Hämagglutination darstellt. Der zweite Schritt ist die Elution, die Wiederabspaltung des Virus, wodurch die Erythrozytensuspension wieder eine homogendisperse Beschaffenheit annimmt. Die Adsorptionsrezeptoren am Erythrozyten werden

beim Abspalten zerstört. Sofern genügend Virusteilchen vorhanden waren, sind alle Rezeptoren zerstört und damit bindungsunfähig geworden. Der Zusatz neuer Virusteilchen der gleichen Art ruft keine Agglutination mehr hervor. Durch Zusatz einer anderen Virus-suspension läßt sich aber ein erneutes Verklumpen der Erythrozyten erreichen, was zeigt, daß die Bindung an spezifische Rezeptoren gebunden ist. Das von der Zelle eliminierte Virus geht aus der Hämagglutination unverändert hervor und ist in der Lage, frische Blutkörperchen zu agglutinieren. Die Hämagglutination kann nun verhindert werden, wenn der Virus-suspension vor dem Zusammenbringen mit der Erythrozytenlösung spezifisches Antiserum zugesetzt wird. Geht das Virus die Antigen-Antikörperverbindung ein, so kann es sich nicht am Rezeptor anlagern und die Agglutination unterbleibt. Schon HIRST, Mc CLELLAND und HARE stellten bei ihren ersten Untersuchungen fest, daß die Hämagglutination der Influenzaviren A und B durch den Zusatz korrespondierender Immunsera in typspezifischer Weise aufgehoben werden kann. Dieser Befund bestätigte sich nicht nur für Influenzaviren, sondern trifft auch auf viele anderen Viren zu.

Trotz der großen Anfangserfolge des Hämagglutinationstests zeigte es sich bald, daß die Reaktion von zahlreichen Variablen abhängig ist, die die serologische Antigenanalyse stark beeinträchtigen können. So sind alle drei Reaktionskomponenten, Serum, Virus und Ery-

throzyten keine festen Komponenten, sondern zeigen von Fall zu Fall individuelle Eigenschaften. Störend tritt ferner hinzu, daß es außer den Antikörpern auch unspezifische Inhibitoren im Serum gibt, die eine Hemmung in unspezifischer Weise verursachen und eine Titererhöhung vortäuschen können. Aufgrund dieser Nachteile wurde der Hämagglutinationstest weitgehend zugunsten der Komplementbindungsreaktion aufgegeben.

Der Wert bei Epidemien, wo es auf einfache und schnelle Anwendung ankommt, ist allerdings unbestritten. Eine besondere Form der Hämagglutination ist die sogenannte Kälteagglutination (36).

In mancher Hinsicht können die Serumeiweißelektrophorese und noch ausführlicher die Immunelektrophorese die Virusserologie vervollständigen. Die Grundlage dafür ist der gleichmäßige Anstieg von Antikörpern, beziehungsweise von Gammaglobulinen bei einer Virusinfektion. Auf dieser Grundlage gelang BLUMBERGER (7) beim Q-Fieber der elektrophoretische Nachweis einer Vermehrung von α -Globulinen, die gegenüber anderen bekannten Infektionskrankheiten wesentlich höhere Werte zeigten. Für die Routinediagnostik hat die Serumelektrophorese allerdings wenig Bedeutung (67).

Bei verschiedenen Virusinfektionen kann ein Hauttest durchgeführt werden. Er soll die Immunitätslage eines Patienten bei intrakutaner Injektion

eines Virusantigens anzeigen. Fehlen Antikörper im Serum des Patienten, so kommt es zu einer Hautreaktion, die Aufschluß über die Art einer Erkrankung geben kann. SORELL (70) berichtet in einer Übersicht über den Hauttest bei der Katzenkrankheit, der infektiösen Hepatitis, bei Influenza, Trachom, Herpes simplex, Lymphogranuloma inguinale, vulgären Warzen und spitzen Condylomen. Die praktische Bedeutung ist gering.

In den letzten Jahren setzt sich mehr und mehr die Immunfluoreszenztechnik als neue serologische Methode durch. Der Nachweis von Antigen erfolgt mit Hilfe von fluoreszeinmarkierten Antikörpern und ist besonders für die Routineschnelldiagnostik geeignet. Das Prinzip stellt sich folgendermaßen dar: Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen über Kovalenzbindungen gekoppelt, wobei ihre serologische Spezifität erhalten bleibt. Die Verbindung des fluoreszeinmarkierten Antikörpers mit dem Antigen ist fest, während andere markierte Proteine durch Waschen entfernt werden können. Bei Bestrahlung mit UV-Licht kann der Antigen-Antikörperkomplex durch seine Fluoreszenz sehr gut erkannt werden. Der besondere Vorteil dieses Verfahrens ist es, daß die hohe Spezifität des serologischen Verfahrens mit der hohen Empfindlichkeit des Nachweises von Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert werden konnte.

Die Entwicklung der Immunfluoreszenztechnik kann als Einzelleistung von COONS bezeichnet werden, da er als erster den Gedanken hatte, Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Antikörpern zu verwenden (13). Er markierte schon im Jahre 1941 Antipneumokokkenserum mit Anthracenisocyanat. Die so behandelte Antikörperlösung agglutinierte die Pneumokokken weiterhin spezifisch, und die Agglutinate fluoreszierten brillant im UV-Licht. Inzwischen ist es gelungen, eine Vielzahl von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, wozu heute meist Fluoresceinisothiocyanat und Rhodamin-B-Isothiocyanat verwendet werden.

Aber nicht nur für die Allgemeindiagnostik ist diese Technik unentbehrlich geworden, sondern vor allem für das Studium der Entwicklung und Ausbreitung des Antigens in der Zelle. Gerade mit Hilfe der Immunfluoreszenz war es erst möglich, die Vorgänge bei einer Infektion in der Zelle zu lokalisieren und mikroskopisch zu verfolgen. So ist dieses Verfahren heute besonders aus der Virusforschung nicht mehr wegzudenken.

Die serologische Varizellen-Zosterdiagnostik stützt sich im wesentlichen auf die Komplementbindungsreaktion und den Neutralisationstest. Mit Hilfe dieser beiden Methoden war es möglich, die antigene Gleichheit von Varizellen- und Zosterviren zu beweisen. TAYLOR-ROBINSON u. DOWNIE (72) gelang dies sowohl durch gekreuzte Komplementbindungsreaktionen als auch im Neutralisationstest. WELLER und COONS (78) entwickelten auf

der Grundlage der Immunfluoreszenz ebenfalls ein Verfahren zur Diagnostik. Auch durch ihre Untersuchungen wurde die Identität von Varizellen- und Zosterviren bestätigt. In der Empfindlichkeit erwies sich die Fluoreszenztechnik der Komplementbindungsreaktion ebenbürtig.

6. Elektronenmikroskopie

a) Dünnschnittechnik

Die Dünnschnittechnik macht es möglich, Viren im Gewebe für die elektronenoptische Darstellung zu präparieren (65,69). Mit einem modernen Ultramikrotom können Schnittdicken jeder gewünschten Dicke zwischen 10 und 200 μ m hergestellt werden. Das Problem der konstanten Schnittdicke konnte durch den mechanischen Vorschub gelöst werden. Geräte mit mechanischem Vorschub liefern Schnittdicken bis zu 25 μ m, die auf mechanischem Wege durch Verstellen einer Mikrometerschraube erreicht werden. Geräte mit thermischem Vorschub basieren auf dem Prinzip der unterschiedlichen Ausdehnung eines Metallblocks bei verschiedenen Temperaturen. Durch das gezielte Erwärmen der Metallblocks, der den Vorschub regelt, können extrem geringe und konstante Schnittdicken erreicht werden. Um aber Gewebe überhaupt schnittfähig zu machen, muß es in geeigneter Weise eingebettet werden. Hierzu ge-

hören die vorherige Fixierung und die Entwässerung des Präparates mit Alkohol oder Azeton, da alle wasserlöslichen Substanzen im Elektronenstrahl verdampfen würden. Das entwässerte Material wird in flüssigen Kunststoff eingebettet, der nach der Polymerisation einen harten, schneidfähigen Block liefert.

Das Standardeinbettungsmittel der frühen Jahre war Methacrylat, heute werden Polyester und Epoxyharze verwendet. Die Vorteile des Materials sind bequeme, sichere und reproduzierbare Einbettung, dazu Eindringungsvermögen in das entwässerte Präparat und gute Schneidbarkeit. Die Schrumpfung bei diesen Kunststoffen ist wesentlich geringer, und die Polymerisation erfolgt gleichmäßiger. Um Extraktionen einzelner Zellbestandteile und Denaturierung bei der Entwässerung zu vermeiden, wurden auch wasserlösliche Einbettungsmittel entwickelt.

Die großen Erfolge der Dünnschnittechnik in der Virologie beruhen auf der Möglichkeit, die Beziehung zwischen Wirtszellen und Viren, sowie das Verhalten der Viren in der Zelle und im extrazellulären Raum zu studieren. Besonders in Verbindung mit der Gewebekulturtechnik, die es ermöglichte, alle Entwicklungsstadien und Abläufe zu reproduzieren, konnten viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. Darüber hinaus kann die Möglichkeit der Vergleichsuntersuchungen

durch negativkontrastierte Dünnschnitte die Bedeutung dieser Technik für die Virologie nur unterstreichen.

b) Negativkontrastverfahren

Eine weitere Möglichkeit, Viren für die elektronenoptische Darstellung zu präparieren, ist das direkte Verfahren mit der Negativkontrastdarstellung. Vorteile sind die Einfachheit der Präparationstechnik und das rasche Vorliegen des Ergebnisses. Ein Überblick über theoretische Grundlagen und praktische Methodik wird in Kapitel III gegeben, eigene Untersuchungen folgen in Kapitel IV.

III. Das Negativkontrastverfahren

1. Historischer Überblick

FARRANT beobachtete im Jahre 1954 als erster den Effekt des negativen Kontrastes im Elektronenmikroskop bei Strukturstudien an Ferritinmolekülen.

Die Negativkontrastierung von Viren geht auf Beobachtungen von HALL (20) und HUXLEY (25) zurück. HALL fand bei positiv kontrastierten Pflanzenviren (bushy stunt virus, tobacco mosaic virus) kleinere, nicht kontrastierte Bezirke, in denen die Viren durch bloßes Einbetten in das Kontrastierungsmittel wesentlich besser dargestellt wurden. HUXLEY unternahm weitere Untersuchungen an Tabak-Mosaik-Viren, bei denen er sich die Beobachtung HALLs zunutze machte. Es gelang ihm, den hohlen Achsenzylinder des Virus, der schon durch Röntgenbeugung errechnet worden war, erstmals im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen. Der dunkle Mittelfaden, der durch das Eindringen der Metallsalze in den hohlen Achsenzylinder des Virus entstanden sein mußte, verschwand nach gründlichem Auswaschen wieder. Es handelte sich also nicht um eine Kontrastierung durch chemische Anlagerungsprozesse, wie sie bei der Positivkontrastierung auftritt. Voll entwickelt wurde die Methode durch HORNE und BRENNER (24), BRENNER und HORNE (9), die ebenfalls Pflanzenviren (turnip yellow mosaic virus) untersuchten.

Die routinemäßige Anwendung des Negativkontrastverfahrens konnte durch weiterführende Arbeiten von VALENTINE und HORNE (73) und BRADLEY (8) gesichert werden. VALENTINE und HORNE erforschten die Grundlagen der Negativkontrastierung, indem sie Polystyrol- und Latexkugeln sowie Proteinkristalle negativkontrastierten und die gewonnenen Erkenntnisse auf biologisches Material (Tabakmosaik-Viren und Flagellaten) übertrugen. BRADLEY führte seine Untersuchungen an Phagen durch.

Für die Dermatologie ergab das Negativkontrastverfahren die Möglichkeit, Viruserkrankungen der Haut einfach und in kürzester Zeit zu diagnostizieren. Zu erwähnen ist hierbei besonders die rasche und sichere Abgrenzung der Pocken von schweren Varizellen-Zostererkrankungen, die wegen der großen Tragweite der Pockenausbreitung in der Praxis von großer Bedeutung ist. Auf die Möglichkeit der Virusdiagnostik mit dem Negativkontrastverfahren in der Dermatologie wiesen schon früh WILLIAMS, ALMEIDA und HOWATSON (80) hin, die in ihrer Arbeit die häufigsten Viruserkrankungen der Haut berücksichtigten.

2. Theoretische Grundlagen

Mit einem modernen Elektronenmikroskop ist es heute möglich, eine Auflösung von unter $5 \text{ \AA}$ zu erreichen. Dies bedeutet eine Auflösung bis hinab zu großen Atomen und zeigt, daß das Auflösungsvermögen allein nicht der Begrenzungsfaktor für die Erforschung biologischer Ultrastrukturen ist. Vielmehr liegen die Probleme in den Präparationsmethoden. Wichtig ist die Frage, wie Elektronenstrahl und Vakuum das Präparat verändern oder schädigen. Das biologische Material muß so vorbereitet sein, daß es unter möglicher Erhaltung seiner Struktur bei der Darstellung genügend Kontrast liefert.

Ursächlich für die Kontrastentstehung im Elektronenmikroskop ist die Dichte eines Teilchens. Erst bei ausreichender Dichte werden die Elektronenstrahlen im Mikroskop so gebeugt, daß ein kontrastreiches Hell- Dunkelbild entsteht. Die Beziehung von Kontrast und Dichte wurde erstmals von BURGE (11) erörtert. Danach sollte ein Teilchen, gleich welcher chemischen Zusammensetzung, im Elektronenmikroskop gut sichtbar werden, wenn das Produkt aus Durchmesser (in $\text{\AA}$) und Dichte (g cm^{-3}) mehr als 400 ist. Um ein Teilchen überhaupt sichtbar zu machen, sollte dieses Produkt mehr als 100 sein. Da biologisches Material eine Dichte von ca. 1 hat, ist es sehr schwer, irgendeine

Struktur unter 100 Å aufzulösen, ohne vorher durch geeignete Maßnahmen den Kontrast zu erhöhen.

Bei der Positivkontrastierung werden Ultradünnschnitte oder eingetrocknete Suspensionen organischer Substanzen durch Einwirkung von Schwermetallsalzlösungen kontrastiert. Hierbei kommt es zu einer chemischen Bindung zwischen Molekülen des Schwermetallsalzes und Molekülen der organischen Substanz. Der Überschuß an Metallsalzen kann durch nachträgliches Waschen entfernt werden. Der im Präparat verbleibende Anteil erhöht die Dichte des Objektes und somit den Kontrast. Auf dem hellen Untergrund der Trägerfolie erscheinen nun die Teilchen dunkel. Der Begrenzungsfaktor dieses Verfahrens liegt in der chemischen Bindung Objekt- Metallsalz. Intensives oder mehrmaliges Kontrastieren ist nicht möglich, da die empfindlichen Präparate zerstört oder doch wesentlich verändert werden. Im günstigsten Fall ist mit der Positivkontrastierung eine Verdoppelung des Kontrastes und damit Verdoppelung der Auflösung zu erreichen.

Beim Verfahren der Negativkontrastierung wird ebenfalls versucht, mit Hilfe von Schwermetallsalzen die Dichte eines Objektes zu erhöhen. Es wird aber keine chemische Bindung Objekt-Metallsalz angestrebt, sondern eine möglichst vollständige Einbettung des

Teilchens in eine dichte amorphe Schicht des Schwermetallsalzes. Oberflächenrelief und etwaige Hohlräume werden dabei von Molekülen der Lösung ausgefüllt, so daß Strukturdetails sichtbar werden. Da die Teilchen aufgrund ihrer geringeren Dichte durchstrahlbarer sind als die sie umgebende Schicht des Metallsalzes, erscheinen sie hell auf dunklem Grund. Sie erscheinen dann im umgekehrten (negativen) Kontrast. Die Dichtedifferenz zwischen Objekt und Schwermetallsalz ist hierbei maßgebend für den entstehenden Kontrast. Biologisches Material mit der Dichte 1 und Schwermetallsalz mit der Dichte 4 ergibt eine Verdreifachung des Kontrastes gegenüber dem unbehandelten Objekt.

Dies konnte auch durch die Untersuchungen HALLs (20) bestätigt werden, der bei seinen Messungen eine Vierfachung der Dichte gegenüber dem unbehandelten Objekt als Maximum nachweisen konnte. Aus den vorherigen Überlegungen zur maximalen Auflösung eines Objekts im Elektronenmikroskop ergibt sich als Grenzwert der Negativkontrastierung eine Größendarstellung von etwa 20 - 30 Å. Daß dies auch in der Praxis zu erreichen ist, zeigen die Ergebnisse BRADLEYS (8). Ihm gelang es, bei Größenvergleichsmessungen in einem besonders günstigen Fall eine Auflösung von 15 Å zu erreichen. Der Autor verhehlt aber nicht, daß die Durchschnittswerte bei 30 Å liegen.

Die Schwermetallsalzlösung als kontraststeigernder Faktor ist bei der Negativkontrastierung von entscheidender Bedeutung. Sie soll möglichst, ohne mit dem Objekt zu reagieren, eine strukturlose, elektro-nenoptisch dichte Schicht bilden, in welche die Partikel eingebettet sind. Die chemische Zusammensetzung der Kontrastierungslösungen hat wenig oder gar keine Bedeutung für die Kontrastausbeute. Es kommen nur Schwermetallsalze als Kontrastierlösungen in Frage.

Sowohl bei der sukzessiven, als auch bei der simultanen Präparationstechnik bleibt die Schwermetallsalzlösung als dünner Film auf dem Objektträger zurück und trocknet schnell ein. Das gelöste Salz geht in den festen Zustand über und legt sich in dünner Schicht über Träger und Objekt. Relativ unlösliche Salze kristallisieren schon in der Anfangsphase der Trocknung aus und lagern ihre Kristalle ab. Salze hoher Löslichkeit trocknen amorph, das heißt, ihre Moleküle sind nicht in regelmäßiger Kristallstruktur angeordnet. Sie ergeben deshalb eine strukturlose, elektronenmikroskopisch dichte Schicht. Der Effekt der Negativkontrastierung beruht gerade auf dieser amorphen Trocknung der Lösung. Eine wichtige Eigenschaft ist deshalb hohe Löslichkeit der Kontrastierungslösung. VALENTINE und HORNE (73) konnten die direkte Abhängigkeit optimaler Kontrastierung von optimaler Löslichkeit des Kontrastmittels zeigen.

Ihre Untersuchungen ergaben, daß wenigstens 80 Gramm Schwermetallsalz/100 ml Wasser löslich sein müssen, um ausreichenden Kontrast zu erzeugen. Leider besteht zwischen den Komponenten Dichte und Löslichkeit keine direkte Beziehung, so daß es eine Reihe von Schwermetallsalzen gibt, die aufgrund ihrer Dichte ideale Kontrastierungsmittel wären, infolge geringer Löslichkeit aber nicht verwendet werden können. Als weitere Eigenschaft sollte die Kontrastierungslösung einen hohen Schmelzpunkt haben, damit kein Material im Elektronenstrahl schmilzt oder verdampft. Es sollte sich außerdem gut spreiten lassen, um einen gleichmäßig dicken Film zu erzeugen. Gleichbleibende Resultate sind nur so möglich.

Früher wurde auf die Einhaltung eines bestimmten pH-Wertes, meist des Neutralpunktes, großer Wert gelegt. Heute wird dem nicht mehr die Bedeutung beigemessen, obwohl der Neutralpunkt für allgemeine Untersuchungen nach wie vor am besten geeignet scheint. Es hat sich aber gezeigt, daß die chemische Zusammensetzung des biologischen Materials ausschlaggebend für die Wahl des pH-Wertes sein muß, und Abweichungen vom Neutralpunkt so oft hilfreich sein können. Kontrastierungslösungen werden meist in Konzentrationen von 0,5 % - 3 % verwendet, sie können aber auch in recht weiten Konzentrationsbereichen angewandt werden. Zusätzlich kann die Menge des beim Eintrocknen anfallenden Salzes noch über das auf dem Träger verblei-

bende Volumen geregelt werden. Die drei Standardlösungen Phosphorwolframsäure, Uranylacetat und Ammoniummolybdat werden gewöhnlich in 1 - 2%iger Konzentration angewandt.

Optimale Eigenschaften einer Lösung werden, wie gezeigt, nur von physikalischen Faktoren bestimmt. Ihre chemische Zusammensetzung ist praktisch ohne Bedeutung. So kommt es, daß gute Resultate bei der Negativkontrastierung stark von der Präparationstechnik und vom biologischen Material bestimmt werden.

Das Erscheinungsbild bei der Negativkontrastierung kann sehr vielfältig sein, da der Bildkontrast durch viele Faktoren beeinflusst wird. Beim echten Negativkontrastierungseffekt ist die Massendichte am Ort der Teilchen geringer, wodurch die Schicht an diesen Stellen durchstrahlbarer wird. Dabei wird entweder die Dickenverteilung des ganzen Teilchens bei vollständiger Umhüllung im Negativ abgebildet, oder bei nur teilweiser Einlagerung des Teilchens in die Schicht wird vorzugsweise das Oberflächenrelief auf der Unterseite des Teilchens abgebildet. Daneben können Kontrastierungslösungen in zwischenmolekulare Plätze eines Teilchens eindringen, sodaß diese dunkel erscheinen. Diese sind nur durch Adsorptionskräfte gebunden und können nachträglich ausgewaschen werden. Das Erscheinungsbild kann auch durch teilweise Positivkontrastierung zustande kommen, wenn Kontrastie-

runungslösung und Objekt miteinander reagieren. Dieser Faktor läßt sich stark durch den pH-Wert der Lösung beeinflussen. Ebenso ist der Eigenkontrast eines Objektes zu berücksichtigen, wie er an eingetrockneten, unkontrastierten Objekten gefunden wird.

Ein wichtiger Punkt bei der Abbildung sind Artefakte, die sich in präparationsbedingte und färbungsbedingte unterteilen lassen. Zu den Präparationsartefakten gehört der Effekt der Oberflächenspannung und der Flüssigkeitsströmung beim Eintrocknen. Wie sich besonders bei kleineren und plastischen Objekten gezeigt hat, kann die Oberflächenspannung erheblichen Einfluß auf die Größendarstellung eines Teilchens nehmen. Es kann sogar zum Kollaps oder Platzen der Teilchen kommen (60). Zu den Färbungsartefakten gehören die Veränderungen der Struktur, die das Kontrastierungsmittel selbst verursacht. Dabei kann es sowohl zu einer Zerstörung, als auch zu einer Stabilisierung der Strukturen kommen. JOHNSON und HORNE (27) konnten zeigen, daß eine Stabilisierung dann eintritt, wenn das Kontrastierungsmittel schneller trocknet als das Objekt.

Ein ungeklärtes physikalisches Phänomen ist der sogenannte anomale Kontrast. MÜLLER und MEYERHOFF (46) beobachteten bei der Negativkontrastierung von Polystyrolkugeln, daß Kugeln, welche in Phosphorwolframsäure eingebettet sind, heller erscheinen als freiliegende. Nach dem Auswaschen der Phosphorwolfram-

säureschicht ergaben sich zwischen den Kugeln keine Unterschiede. Auch Magnesiumoxydkristalle, die nachträglich auf eingetrocknete Phosphorwolframsäure aufgeraucht wurden, erschienen heller, obwohl man erwarten sollte, daß der Kontrast größer wird, indem sich derjenige der Phosphorwolframsäureschicht und des Kristalls addiert. Sie versuchten diese Erscheinung durch Aufladungseffekte zu erklären, die zur Ausbildung kleiner elektrostatischer Mikrolinsen im Objekt führen sollen LIPPERT (37) wiederholte diese Versuche, konnte aber keine erhöhte Bildhelligkeit feststellen. Er nimmt an, daß Phosphorwolframsäure stark hygroskopisch ist und die Kristalle darin versinken. Gegen diese Deutung spricht aber, daß der Effekt auch auftritt, wenn man die Kristalle auf der Unterseite der Folie aufräucht.

Ein anderes häufig bei Viren beobachtetes Phänomen ist die Darstellung der Partikel mit "vollem" und "leerem" Core . Mehrere Autoren (66,78,14) glauben, daß die Hohlform durch das Fehlen von Nukleinsäuren und damit auch der Infektiosität zustande kommt. Andere wiederum halten gerade diesen Typ für biologisch aktiv (44). PETERS, MÜLLER und GEISTER untersuchten diese Erscheinung und sind der Meinung, daß die entstehende Virusform stark von der Präparationsmethode abhängt. Durch geeignete Maßnahmen konnten sie entweder überwiegend die eine oder die andere Form reproduzieren (64). Auch KLUG und BERGER (32)

versuchten bei ihren Untersuchungen die vielen ungelösten Effekte der Abbildung aufzuhellen. Sie fanden, daß der Kontrast grundsätzlich auf Ober- und Unterseite eines Objektes entwickelt wird. Das entstehende Bild wäre demnach ein zusammengesetztes Überlagerungsbild aus Oberflächen- und Unterseitenabbildung. Dies würde die oft entstehenden, völlig ungeordneten und zerrissenen Abbildungen der Strukturen erklären, die bei unbeschädigten Partikeln nicht vorhanden sein können. In einem solchen Fall würde das Bild der Oberfläche und Unterseite nicht übereinstimmen, und das zusammengesetzte Überlagerungsbild eine Umordnung der Strukturen vortäuschen. Anhand geeigneter Messungen konnten die Verfasser auch nachweisen, daß die Größe des Kontrastes abhängig ist von der Eindringtiefe der Kontrastierlösung in das Objekt.

Die zuletzt gemachten Ausführungen haben gezeigt, daß zahlreiche unterschiedliche Erscheinungsformen und Effekte zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht befriedigend erklärt werden können. Soviel das Negativkontrastverfahren zur Auffindung neuer Strukturen beitrug und insbesondere die Morphologie der Viren aufklären half, so wenig gesichert ist bisher ihr Abbildungsmechanismus.

3. Empfohlene Methoden

Beim Studium der Literatur zeigt sich, daß es eine einheitliche Präparationstechnik bei der Negativkontrastierung nicht gibt. Vielmehr steht ein umfangreicher Methodenkomplex zur Verfügung, aus dem man entsprechend der Aufgabe die geeigneteste Methode auswählen sollte (56). Die meisten Autoren gehen dabei von gewissen Grundvoraussetzungen aus und ermitteln empirisch die besten Bedingungen. Dies erscheint auf den ersten Blick konzeptlos. Wenn man aber weiß, daß schon durch geringfügige Änderungen der Methode stark abweichende Ergebnisse erzielt werden können, wird man gerade durch angebrachte Variationen der Methodik ein einmal erhaltenes Ergebnis zu untermauern suchen. Dies gilt weniger für die allgemeine Diagnostik als für die Darstellung spezieller Strukturen.

Die Negativkontrastierung kann durch zwei verschiedene Techniken erreicht werden. Bei der Sukzessivtechnik wird zuerst das Objekt auf den Träger gebracht und anschließend das Kontrastierungsmittel. Bei der Simultantechnik werden die zu untersuchende Suspension und das Kontrastierungsmittel vermischt und dann auf den Träger übertragen. Das Vorgehen bei der sukzessiven Methode erlaubt es, zwischen den

beiden Schritten Adsorption und Kontrastierung, zusätzliche Reaktionen durchzuführen, da Untersuchungsmaterial und Kontrastlösung getrennt aufgebracht werden. Die Technik selbst bietet mehrere Möglichkeiten. Für schnelle Orientierungsversuche eignet sich die Tropfenmethode (59).

Auf eine Dentalwachsplatte werden ein Tropfen der Suspension und ein Tropfen der Kontrastierungslösung pipettiert. Im Falle mehrerer Reaktionen können die Lösungen in deren Reihenfolge aufgetropft werden. Das Trägernetz wird nun auf den Suspensionstropfen gelegt, nach erfolgter Adsorption getrocknet oder abgesaugt, und dann auf die weiteren Tropfen übertragen. Bei dieser Technik sollte man stabile Trägerfolien verwenden, da die wiederholte Übertragung bei empfindlichen Folien nicht angebracht ist. Bei dünnen Folien empfiehlt sich die Ein-Tropfen-Methode. Man legt das Netzchen auf einen Tropfen der Suspension, saugt mit einer Kapillarpipette vom einen Rand die Flüssigkeit ab, während man gleichzeitig vom anderen Rand das Kontrastierungsmittel zufließen läßt. Das Netz bleibt hierbei gleichmäßig feucht, und es besteht keine Gefahr für den Film (58).

Bei der sogenannten Auftropfmethode wird nicht das Netz auf den Tropfen, sondern der Tropfen auf das Netz gebracht. Mittels einer Kapillarpipette wird die Suspension aufgetropft, nach Adsorption abgesaugt und sofort mit einem Tropfen Kontrastierungslösung versetzt, wiederum abgesaugt und getrocknet. Diese

Technik hat den Vorteil, daß durch gezieltes Absaugen der auf dem Netzchen verbleibende Flüssigkeitsfilm, sowohl bei der Adsorption, als auch bei Kontrastierung gesteuert werden kann. KLEINSCHMIDT, LANG, JACHERTS und ZAHN benützen zum Aufbringen des Materials auf den Träger das von ihnen entwickelte Spreitungsverfahren. Dazu wird die Suspension mit mehreren Lösungen, der sogenannten Hypophase versetzt, die nach dem biologischen Material und den Präparationsbedingungen ausgerichtet ist (31). Diese Spreitungsmethode soll sich besonders für Makromoleküle, Virussuspensionen und Membranen eignen.

Eine für höchste Auflösung geeignete Modifikation beschrieben VALENTINE, SHAPIRO und STADTMAN (1968) für Enzymuntersuchungen (74). Sie ließen ein Glimmerblättchen, das mit Kohle bedampft wurde, so auf die Oberfläche der Suspension abflottieren, daß der Rand des Kohlefilms an dem Glimmerplättchen haften blieb. Nach entsprechender Adsorption wurde der Glimmer mit dem Kohlefilm und den adsorbierten Teilchen abgezogen und auf die Oberfläche eines Kontrastierungsmittels gebracht, wobei sie den Kohlefilm diesmal ganz abflottieren ließen. Nach Auflegen von Netzen konnten sie den Film mit Hilfe von Filterpapier aufnehmen. Als Pseudoreduktion bezeichnet man ein Verfahren, das MURRAY, HALL, MYRTLE und MARAK (1970) zum Studium von Bakterienzellwänden anwandten. Hierzu gießt man die zu

untersuchende Suspension auf eine Agarschicht und läßt sie aufsaugen. Anschließend wird auf die Oberfläche Kollodiumlösung in Amylacetat gegossen. Nach dem Verdunsten des Amylacetat flottiert man den zurückbleibenden Kollodiumfilm auf eine Kontrastierlösung ab, wo er mit Filterpapier aufgenommen werden kann (48).

Bei der "simultanen Technik" wird Suspension und Kontrastierungsmittel im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Das Aufbringen auf den Träger kann auf verschiedene Weise erfolgen. Die Mischung kann in einem gewöhnlichen Zerstäuber oder mit Druckluft auf Netzen gesprüht werden. Dazu sollte der Film gut benetzbar sein, um ein gleichmäßiges Verteilen der Tröpfchen zu gewährleisten. Sind die Tröpfchen gleichmäßig und fein auf der Filmoberfläche verteilt, so eignet sich diese Methode für quantitatives Arbeiten. Bei einer anderen Technik wird die Mischung mit einer Platinöse aufgenommen. Mit der Unterseite des filmartig gespannten Tropfens adsorbiert man ein Netz und drückt nun die Öse auf Filterpapier. Der Überschuss an Flüssigkeit wird dabei schnell abgesaugt, auf dem Netz bleibt ein homogener Film zurück. NERMUT wies darauf hin, daß bei dieser Methode die Objektkonzentration höher sein sollte als bei anderen Techniken, da ein großer Prozentsatz der Suspension durch das Filterpapier weggerissen wird (57). Die dritte Möglichkeit besteht darin, einen Tropfen der Mischung

mit einer Kapillarpipette auf ein Netz aufzutropfen und abzusaugen, oder das Netz auf den Tropfen aufzulegen und nach beendeter Adsorption abzusaugen. Bei dieser Art werden die Teilchen durch Diffusion vom Netzchen adsorbiert. Arbeitet man mit geringer Teilchenkonzentration, so sollte die Suspension länger auf dem Netzchen bleiben, damit der Film genügend Teilchen aufnehmen kann. Bei hoher Konzentration genügen kurze Adsorptionszeiten. Da die Adsorption an dem Film durch Diffusion zustande kommt, ist bei inhomogenen Substanzen die Gefahr der Selektion gegeben, wenn Partikel unterschiedlicher Größe und Qualität vorhanden sind. In einem solchen Fall empfiehlt sich die Anwendung einer zuverlässigen quantitativen Methode z. B. der Aufsprühtechnik. Ein weiterer Punkt, dem gewisse Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte, ist das Absaugen. Durch Anlegen von Filterpapier an den Rand des Netzchens kann der Tropfen kontinuierlich abgesaugt werden, damit ein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm zurückbleibt.

Bei allen bisher beschriebenen Techniken wird das Objekt meist ganz von der Kontrastierungslösung eingehüllt. Als Folge davon wird sowohl die Struktur der Ober-, als auch der Unterseite der Teilchen abgebildet und im Bild übereinanderprojiziert. Dies kann, wie bereits erwähnt, zu Verzerrungen der Abbildung führen (32). Um diese Gefahr auszuschließen wurde verschiedentlich versucht, einseitige Abbildungen von Objekten zu erhalten.

PETERS, MÜLLER und GEISTER, MÜLLER und PETERS ließen die Suspension ganz auf dem Netz eintrocknen und brachten dann erst einen Tropfen Kontrastierungsmittel auf, den sie kurz einwirken ließen und dann absaugten (47,64). Hierdurch wird von einem großen Teil der Objekte nur die Oberseite abgebildet. Bei diesem Vorgehen trocknen die Teilchen allerdings ganz ein bevor sie kontrastiert werden, und es besteht die Gefahr, eine durch Schrumpfung veränderte Oberfläche sichtbar zu machen. PADGET und LEVINE (1966) beschrieben solche Unterschiede bei der Anwendung der normalen "feuchten" und der eben beschriebenen "einseitigen" Kontrastierungsmethode (62). Die Kontrastierung von "unten" wurde von ANDERER, SCHLUMBERGER, KOCH, FRANK und EGGERS beschrieben (3). Sie ließen einen Tropfen Kontrastierungslösung auf einem Netz unter einer Lampe gut eintrocknen. Anschließend tropften sie Virussuspension auf und saugten sofort ab. Ein gewisser Teil der Objekte wurde dann nur von "unten" kontrastiert.

Um die Oberflächenspannungskräfte auszuschalten, kombinierten NERMUT und FRANK die Negativkontrastierung mit der Gefriertrocknung (60). Sie konnten hierbei eindrucksvoll zeigen, daß nach gefriergetrockneter Negativkontrastierung die Teilchen einheitlich in Form und Größe waren, während das vorher nicht der Fall war. Auch die Negativkontrastierung von Ultradünnschnitten ist möglich (4,26,43). ALMEIDA und HOWATSON

beschrieben eine Methode zur negativen Darstellung von intrazellulären Strukturen (1). Sie erlaubt es, die örtliche Beziehung zwischen Objekt und Wirtszelle zu untersuchen. Die große Anzahl der Techniken und die vielen kleinen Variationen zeigen, daß das Vorgehen bei der Negativkontrastierung vielfältig sein kann. Beide grundsätzlichen Techniken, sukzessive und simultane, haben ihre Berechtigung und sollten der Aufgabe entsprechend eingesetzt werden. Der große Einfluß des Objektes, mit seinen vielen Möglichkeiten in Zusammensetzung, Größe, Form und Verhalten auf die zu wählende Methode, soll nochmals betont werden. Ebenso werden der spezielle Zweck - einfache Diagnostik, quantitatives Arbeiten, Hochauflösung - die Wahl der Methode beeinflussen.

4. Ergebnisse früherer Untersuchungen

Zur Weiterentwicklung und Verbesserung der Negativkontrastierung wurden zahlreiche Untersuchungen gemacht. Die drei Komponenten, die hierfür in Frage kommen, sind biologisches Material, Träger und Kontrastierungsmittel. Die geringsten Verbesserungsmöglichkeiten bietet begreiflicherweise das biologische Material. Im Grunde ist nur eine Vorfixierung labiler Objekte möglich, wenn das Kontrastierungsmittel allein den Zerfall des Objektes bewirken würde. Dabei ist zu beachten, daß eine Vorfixierung zwar in der Regel einen Zerfall verhindert, die native Substruktur des Objektes aber durchaus verändern kann. So vernetzen zum Beispiel Di-Aldehyde Proteine, was zur Aggregation führt.

Bei der Auswahl der Filme haben sich lochfreie und ge-
lochte Folien als brauchbar erwiesen. Für Routineunter-
suchungen, bei denen es nicht auf höchste Auflösung
ankommt, eignen sich lochfreie Filme am besten. Kollo-
dium- und Formvarfilme, die man in üblicher Weise her-
stellt, sind gleichermaßen geeignet. Durch Aufdampfen
einer Kohleschicht kann die Folie zusätzlich verstärkt
werden. KLEINSCHMIDT konnte eine Verbesserung der Auf-
lösung bei Kohle verstärkten Filmen dadurch erreichen,
daß er nach erfolgter Negativkontrastierung den pla-
stischen Film durch Erhitzen entfernte (30). Dies ge-
lang ihm sowohl bei Kollodium- als auch bei Formvar-

filmen. Es können auch lochfreie reine Kohlefilme hergestellt werden, die ein höheres Auflösungsvermögen liefern. Mit Lochfilmen, ob rein oder kohleverstärkt, ist ebenfalls hohe Auflösung zu erreichen. Bei dieser Filmart überspannt das Kontrastierungsmittel als dünner Film die Löcher im Träger. Da der Trägerfilm an diesen Stellen fehlt, ist die Schicht sehr dünn und gut durchstrahlbar, was Kontrast und Auflösung verbessert (16). MUELLER, KOLLER und MOOR verwendeten in neuerer Zeit Siliziumoxid- und Graphitfilme (45). Sie sollen aufgrund ihrer geringen Eigenstruktur besonders für höchste Auflösung geeignet sein.

Die Ergebnisse früherer Untersuchungen haben gezeigt, daß sich für einfache und Routineuntersuchungen Kollodium- oder Formvarfilme am besten eignen. Sie sind relativ stabil und können problemlos und schnell hergestellt werden. Soll aber höchste Auflösung erzielt werden, stehen eine ganze Reihe von Filmen zur Verfügung, wovon sich der reine, dünne Kohlefilm besonders gut eignet, der aber auch sehr anfällig ist.

Besonders gründliche Untersuchungen wurden angestellt, um geeignetere Kontrastierlösungen zu finden. VALENTINE und HORNE (1962) definierten erstmals die Eigenschaften, die von einer guten Kontrastierlösung zu fordern sind (73). Sie untersuchten anhand dieser Voraussetzun-

gen eine Vielzahl von Schwermetallsalzen und stellten fest, daß nur wenige in der Praxis verwendbar sind. Bis heute haben sich vorwiegend Salze der Phosphorwolframsäure, der Molybdänsäure und einige Uranylverbindungen bewährt. Am häufigsten verwendet dürfte Phosphorwolframsäure sein, das meist als 2%ige Lösung mit einem pH-Wert von 6,8 angewandt wird. Beim Einstellen des pH-Wertes sollte keinerlei Ausfällung entstehen. Weiter sollte die grobe Annäherung an den gewünschten pH-Wert zuerst mit 1N Kaliumhydroxid- oder Natriumhydroxidlösung erfolgen und dann mit 0,1 N Lösung weitertitriert werden, um die Kontrastlösung möglichst wenig zu verdünnen. Als gute Kontrastlösung hat sich Ammoniummolybdat erwiesen. Es wird ebenfalls als 2%ige Lösung angewandt und mit 1 N Kaliumhydroxidlösung oder 1,5 N Ammoniaklösung auf den gewünschten pH-Wert gebracht. Ammoniummolybdat ist besonders zur Darstellung osmotisch labiler Objekte geeignet (50). Von den Uranylverbindungen hat sich am besten Uranylacetat in 0,5 - 1%iger Lösung bewährt. Die wässrige Lösung hat etwa einen pH-Wert von 4,2. Leider kann sie nur mit Hilfe von Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Komplexbildner auf den Neutralpunkt eingestellt werden. Dabei wird das Korn aber gröber. Uranylacetat sollte immer in einer braunen Flasche aufbewahrt werden, um frühzeitige Ausfällung zu vermeiden. Auch BRADLEY untersuchte eine Reihe verschiedener Kontrastierungslösungen auf ihre Verwendbarkeit (8). Er benutzte dabei abgestufte pH-Werte und erzielte die besten Ergebnisse

meist im neutralen Bereich. Weiter untersuchte er die pH-Wertänderungen während des Eintrocknens der Kontrastierungs-lösungen. Keine Lösung behielt den ursprünglichen Wert bei, die gemessenen Abweichungen betrugen allerdings nie mehr als eine pH-Wertstufe. Dies sollte man in Betracht ziehen, wenn es auf exaktes Einhalten eines bestimmten pH-Wertes ankommt.

WOLANSKI und FRANCKI untersuchten die Wirkung von Phosphorwolframsäure bei unterschiedlichen pH-Werten auf die Morphologie von Viren (81). Sie konnten dabei zeigen, daß der pH-Wert sowohl Form- und Größendarstellung, als auch die Kontrastierungsart beeinflusst. Bei niedrigen pH-Werten wurde die Innenstruktur der Viren dargestellt, was auf eine Durchdringung mit Kontrastierungsmittel schließen läßt, während bei höheren pH-Werten die Viren besonders gut im Umriß dargestellt wurden. Dies läßt vermuten, daß nun das Kontrastierungsmittel die äußere Membran nicht durchdringen konnte. MELLEMA, van BRUGGEN und GRUBER untersuchten Uranyloxalat auf seine Eignung als Kontrastierungsmittel (41). Sie fanden es etwa gleichwertig dem Uranylacetat, mit dem Vorteil, daß es ohne Komplexbildner auf den Neutralpunkt gebracht werden kann. Mit dieser Lösung können speziell Proteine mit niedrigem Molekulargewicht sichtbar gemacht werden, doch ist sie bei pH-7,0 nur wenige Stunden haltbar. LEBERMANN erprobte Uranylformiat, da es die höchste Dichte aller Schwermetallverbindungen aufweist (33). Er fand, daß

höchste Auflösung zu erzielen ist und sich die Lösung besonders zur Darstellung von Makromolekülen eignet. Die Herstellung ist allerdings sehr umständlich, was die routinemäßige Anwendung verhindert. BUCKMIRE und MURRAY verwendeten für die Negativkontrastierung von Bakterienzellwänden Natriumzirkonylglykollat, dessen pH-Wert ohne Präzipitatbildung in weitem Bereich eingestellt werden kann (10). In die Elektronenmikroskopie eingeführt wurde die Lösung erstmals von COHEN (12).

MUSCATELLO und GUARRIERO-BOBYLEVA prüften Kontrastierungsungen im Hinblick darauf, wie weit biologische Prozesse gehemmt oder unterbunden werden (49). Dazu untersuchten sie an isolierten Rattenlebermitochondrien, wie Respirationsrate und Phosphorylase durch verschiedene Kontrastierungsungen beeinflusst werden. MUSCATELLO und HORNE untersuchten die Wirkung der Tonizität einiger Kontrastierungsungen auf die Elementarstruktur membrangebundener Systeme (50). Es zeigte sich, daß alle getesteten Lösungen die Membranen beschädigten oder zerstörten, außer Ammoniummolybdat. Die Tonizität von Ammoniummolybdat stimmt weitgehend mit der biologischen Struktur überein, es ist besonders zur Darstellung von Membranen geeignet.

Obwohl durch viele Untersuchungen bessere und wirkungsvollere Kontrastierungsmittel gesucht wurden, konnten Phosphorwolframsäure, Uranylacetat und Ammoniummolybdat als Standardlösungen nicht ersetzt werden. Phosphorwolframsäure wird wegen seiner problemlosen Anwendung und großen Haltbarkeit am häufigsten verwendet.

IV. Eigene Untersuchungen zur Negativkontrastierung bei Viruserkrankungen der Haut

1. Ermittlungen der besten Methodik

a) Sukzessiv- und Simultantechnik

Zur Ermittlung der besten Methodik wurde sowohl die Sukzessiv-, als auch die Simultantechnik auf ihre Brauchbarkeit für die elektronenoptische Schnelldiagnostik getestet. Quantitative Untersuchungsmethoden konnten ausgeschlossen werden, da allein der qualitative Erregernachweis von Interesse war. Bei der Auswahl der Methode wurde auf schnelle Anwendbarkeit, einfache Arbeitsgänge und möglichst gute Reproduzierbarkeit Wert gelegt. Das Untersuchungsmaterial wurde von ca. 200 Patienten beiderlei Geschlechts gewonnen, wobei alle Altersstufen vertreten waren. Das ausgewertete Bildmaterial umfaßt etwa 300 Aufnahmen. Zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurden die Bläschen mit einer Kanüle angestochen und das an der Spitze haftende Material auf einem sauberen Glasobjektträger ausgestrichen. Ein Absaugen des Bläscheninhalts zur Gewinnung von möglichst viel Material erwies sich als nachteilig, da die Präparate fast ausnahmslos zu dick und somit undurchstrahlbar wurden. Die verwendeten Trägernetze hatten eine Maschenweite von 400 mesh, als Trägerfolie diente Formvarfilm ohne Verstärkung. Die Auswertung der Präparate und das Anfertigen der Aufnahmen erfolgte im Philips-Elektronenmikroskop EM 500 bei einer Strahlenspannung von 60 Kilovolt.

Sukzessivtechnik

Bei den Versuchen zur Sukzessivtechnik wurde die Zwei-Tropfen-Methode angewandt. Sie zeichnet sich durch schnelle Anwendbarkeit, einfache Handhabung und gute Reproduzierbarkeit aus. Hierzu wird das Untersuchungsmaterial auf dem Glasträger mit einem Tropfen destillierten Wasser versetzt und aufgerührt. Durch Auflegen eines Netzchens mit der befilmten Seite auf diesen Tropfen erfolgt die Adsorption der Virussuspension. Beim Abheben des Netzchens verbleibt eine bestimmte Flüssigkeitsmenge auf dem Träger, die wir vollständig eintrocknen ließen. Die Kontrastierung erfolgte dann wiederum durch Auflegen des Netzchens auf einen Tropfen der jeweiligen Kontrastierlösung. Die überschüssige Lösung wird aber diesmal mit Filterpapier abgesaugt. Das Absaugen sollte vom Rand der Blende und langsam erfolgen, damit ein gleichmäßig dicker Lösungsfilm zurückbleibt, der den ganzen Träger bedeckt. Nach dem Trocknen ist das Präparat fertig zur Untersuchung (Beispiel: Abb. 1).

Simultanttechnik

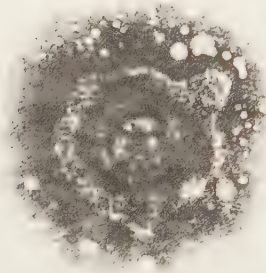
Bei der Anwendung der Simultanttechnik wird das abgenommene Material ebenfalls mit destilliertem Wasser aufgerührt. Mit Hilfe einer Pipette wird nun ein Tropfen der Suspension auf einen neuen Glasträger übertragen und mit einem Tropfen Kontrastierlösung vermischt. Durch Auflegen eines Netzchens auf diesen Tropfen wird das Gemisch übertragen, das Absaugen mit Filterpapier erfolgt in der oben beschriebenen Weise (Beispiel: Abb. 2).

Bei den Vergleichsuntersuchungen mit 2%iger Phosphorwolframsäure vom pH 6,8 zeigte sich, daß die Sukzessivtechnik der simultanen überlegen ist. Nur in einigen Fällen konnten mit der Simultantechnik gleichwertige Ergebnisse erzielt werden. Besonders in der Reproduzierbarkeit war die Sukzessivtechnik deutlich überlegen. Ein Unterschied zeigte sich auch bei der Größendarstellung der Viruspartikel. In Simultantechnik kontrastierte Teilchen werden kleiner dargestellt als bei der Sukzessivtechnik. Die stärkere



Abb. 1: Herpes-simplex-Viren, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure in der Sukzessivtechnik (90 000 : 1).

Schrumpfung der Partikel wird offensichtlich durch die bessere Durchdringungsmöglichkeit der Simultantechnik verursacht, bei der die gesamte Oberfläche des Teilchens von Kontrastierlösung durchdrungen werden kann, während bei der Sukzessivtechnik überwiegend die Oberseite der Teilchen für die Kontrastierlösung angreifbar ist.



2

Abb. 2: Zostervirus, kontrastiert mit Ammoniummolybdat in der Simultantechnik (180 000 : 1).

Bei den Untersuchungen mit Ammoniummolybdat wurde 2%ige Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Die Abbildungsqualität bei beiden Techniken war etwa gleichwertig, wobei aber im Gegensatz zu Phosphorwolframsäure mit der Simultantechnik bessere Reproduzierbarkeit und sicherere Darstellung zu erreichen war. Im Vergleich zu Phosphorwolframsäure kontrastierten Teilchen zeigte Ammoniummolybdat eine auffällige Körnung, wodurch das Bild gröber erscheint. Auffallend war auch die häufig extrem helle Darstellung des Kapsids, die in dieser Form nur bei Ammoniummolybdatkontrastierung in Erscheinung trat. Übereinstimmend mit Phosphorwolframsäure war wiederum die größere Schrumpfung der Partikel bei der Simultantechnik.

Uranylacetat wurde in 1%iger wässriger Lösung getestet, wobei sich der pH-Wert auf 4,2 einstellt. Mit dieser Lösung konnten nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden. Sowohl bei der Sukzessiv-, als auch bei der Simultantechnik erreichten die Ergebnisse nicht die von Phosphorwolframsäure oder Ammoniummolybdat. Der gravierendste Nachteil war die schlechte Reproduzierbarkeit, sodaß nicht von einer ausreichend sicheren Darstellung ausgegangen werden kann. Auffällig war auch die häufige starke Deformation, die die Partikel durch Uranylacetatkontrastierung erlitten. Offensichtlich wurden die Viren durch den sauren pH-Wert mehr geschädigt als bei anderen Lösungen. Auch die schlechte Reproduzierbarkeit deutet darauf hin, daß oft Teilchen durch die Kontrastierlösung ganz zerstört wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Sukzessivtechnik mit Phosphorwolframsäure, die Simultantentechnik mit Ammoniummolybdat die besten Ergebnisse lieferte. Das einfachste Verfahren und die beste Abbildungsqualität zeigte Phosphorwolframsäure, besonders schwierig zu handhaben war Uranylacetat.

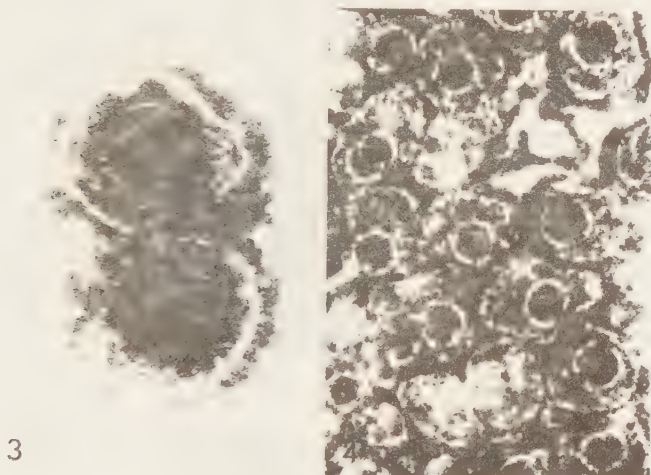
b) Zeitfaktor

Als wichtiger Faktor zum Erzielen guter Ergebnisse erwies sich bei unseren Untersuchungen die Einwirkungsdauer der Kontrastierlösung auf das Präparat. Um die günstigste Zeit zu ermitteln, ließen wir die Kontrastierlösungen unterschiedlich lange auf die Präparate einwirken, wobei eine Versuchsreihe in Sukzessivtechnik, eine zweite in Simultantentechnik durchgeführt wurde. Als Einwirkzeiten bis zum Absaugen wurden 30 sec., 60 sec. und 3 min. gewählt, bei einem Präparat wurde die Kontrastierlösung sofort abgesaugt, bei anderen ließen wir sie vollständig eintrocknen.

Versuch mit Phosphorwolframsäure in der Sukzessivtechnik:

Beim sofortigen Absaugen der Kontrastierungslösung zeigten die Viren in etwa der Hälfte der Fälle kontrastarme Darstellung. Struktureinzelheiten werden noch nicht so differenziert dargestellt, wie es möglich ist; die Diagnose bereitet aber keine Schwierigkeiten. Offensichtlich kann die Lösung bei dieser

kurzen Zeit nicht überall lange genug auf die Partikel einwirken, um sie differenziert darzustellen.



3

Abb. 3: Einzeldarstellung von Zosterviren, 60 sec. kontrastiert mit Phosphorwolframsäure in der Sukzessivtechnik (180 000 : 1).

Abb. 4: Übersichtsdarstellung von Zosterviren, 60 sec. kontrastiert mit Phosphorwolframsäure in der Sukzessivtechnik (90 000 : 1).

Ab 30 sec. werden die Teilchen überwiegend gut kontrastiert, es treten alle Einzelheiten hervor. Core, Kapsid und äußere Hülle sind klar dargestellt. Das Ergebnis bei 60 sec. gleicht im wesentlichen dem bei 30 sec., die Viruspartikel sind optimal kontrastiert (Abb. 3 und 4).

Nach 3 min. Einwirkzeit wird die Abbildungsqualität deutlich schlechter. Die Strukturen sind nicht mehr so kontrastreich, sondern erscheinen wolkig und verwaschen. Äußere Hülle und Kapsid nehmen zum Teil bizarre Formen an, sodaß man annehmen darf, es handelt sich um Deformationen, die durch zu intensives Einwirken der Lösung hervorgerufen wurden. Bei vollständigem Eintrocknen wird die Bildqualität noch schlechter. Nun werden die Teilchen größtenteils zu dunkel, sodaß Struktureinheiten verloren gehen. Die Auflösung wird durch grobe Körnung schlechter, die Teilchen wirken zerrissen und stark deformiert (Abb. 5).

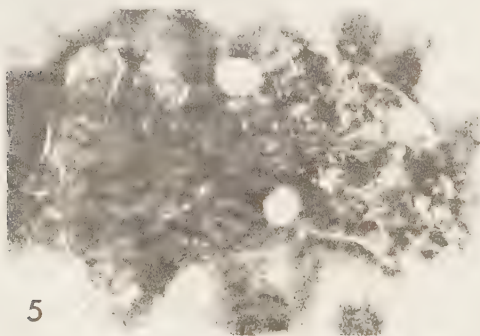
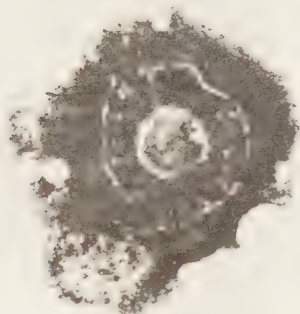


Abb. 5: Zosterviren, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure in der Sukzessivtechnik, nach vollständigem Eintrocknen (180 000 : 1).

Versuch mit Phosphorwolframsäure in der Simultantechnik:



6

Abb. 6: Zostervirus, 2 min. kontrastiert mit Phosphorwolframsäure in der Simultantechnik (180 000 : 1).

Um gute Abbildungen zu erzielen, mußte die Zeit im Vergleich zur Sukzessivtechnik wesentlich erhöht werden. Die besten Ergebnisse ergaben Zeiten zwischen 2 und 3 min. bis zum Absaugen der Kontrastierlösung (Abb.6). Niedrigere Zeiten lieferten zu wenig Kontrast, bei voller Einwirkdauer werden die Präparate dagegen überkontrastiert und somit zu dunkel, um Einzelheiten darzustellen. Nur in einigen Fällen konnten ähnlich

gute Ergebnisse wie mit der Sukzessivtechnik erreicht werden, gewöhnlich blieben aber Kontrast und Auflösung zurück.

Versuch mit Ammoniummolybdat in der Sukzessivtechnik:

Bei diesem Versuch zeigte es sich, daß Ammoniummolybdat einen verhältnismäßig großen Anwendungsbereich hat. Bei allen Zeiten bis 3 min. konnten etwa gleichwertige Abbildungen erzielt werden. Nur bei vollständigem Einwirken waren die Ergebnisse unbrauchbar, da die Bilder zu dunkel wurden. Die Abbildungsqualität ist aber deutlich schlechter als bei Phosphorwolframsäure, bedingt durch das grobe Korn und die wolkige Darstellung, die Ammoniummolybdat liefert.

Versuch mit Ammoniummolybdat in der Simultantechnik:

Gleiche Ergebnisse konnten bei 30 sec. bis 3 min. erzielt werden. Bei kürzerer Zeit sind die Viren zu kontrastlos dargestellt, bei Zeiten über 3 min. erfolgt Überkontrastierung. Präparate mit voller Einwirkungs-dauer waren unbrauchbar. Auch bei dieser Technik zeigt sich ein zeitlich großer Anwendungsbereich, die Bild-qualität ist aber nicht mit der von Phosphorwolfram-säure zu vergleichen. Auffällig war auch hier wieder die grobe Struktur und wolkige Auflösung, die cha-rakteristisch für Ammoniummolybdat ist. Die stärkere Deformation der Partikel, die allgemein bei der Simul-tantechnik beobachtet wurde, war auch hier wieder deutlich (Abb. 7,8 und 9).



7

Abb. 7: Zosterviren, 30 sec. kontrastiert mit Ammoniummolybdat in der Simultantechnik, auffällige Hellfärbung des Kapsids (180 000 : 1).

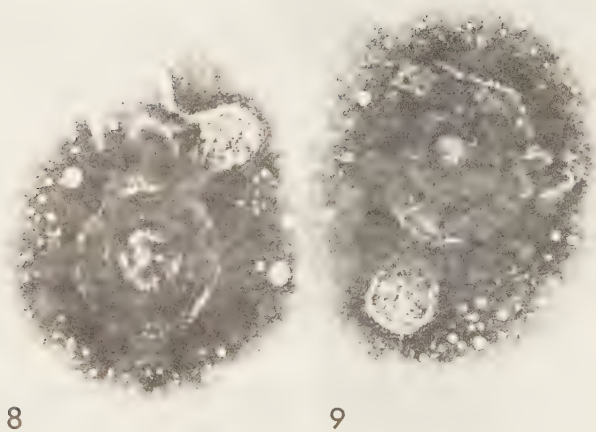
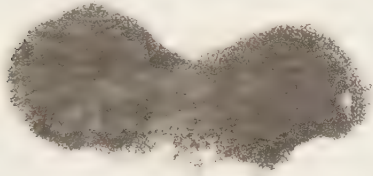


Abb. 8: Zostervirus, 1 min. kontrastiert mit Ammoniummolybdat in der Simultantechnik (180 000 : 1).

Abb. 9: Zostervirus, 3 min. kontrastiert mit Ammoniummolybdat in der Simultantechnik (180 000 : 1).

Versuch mit Uranylacetat in der Sukzessivtechnik:
Mit Uranylacetat waren vergleichsweise nur unbefriedigende Ergebnisse zu erzielen.



10

Abb. 10: Zosterviren, 60 sec. kontrastiert mit
Uranylacetat in der Sukzessivtechnik
(180 000 : 1).

Bei Zeiten bis 30 sec. wurden Abbildungen mit wenig Kontrast und Schärfe erzielt, ab 60 sec. bereits waren die Präparate zu dunkel und völlig unbrauchbar. Auffallend war auch die wesentlich stärkere Schrumpfung der Partikel im Vergleich zu den anderen Lösungen (Abb. 10).

Versuch mit Uranylacetat in der Simultantentechnik:

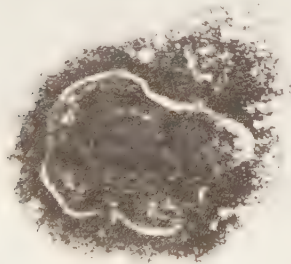
Mit dieser Technik konnten überhaupt keine brauchbaren Resultate in Verbindung mit Uranylacetat erzielt werden. Nur bei sofortigem Absaugen der Lösung ließen sich Viren darstellen, bei allen übrigen Zeiten gelang der Nachweis nicht mehr. Es ist anzunehmen, daß die Teilchen durch den stark sauren pH-Wert des Uranylacetats bei längeren Zeiten ganz zerstört werden. Zusammenfassend muß gesagt werden, daß Uranylacetat bei unseren Versuchen am schlechtesten abschnitt und keine konstanten Ergebnisse zu erzielen waren. Zur elektronenoptischen Schnelldiagnostik ist die Lösung unbrauchbar.

c) Einfluß des pH-Wertes

Um die Brauchbarkeit der Elektronenmikroskopie für die Schnelldiagnostik im Routinelabor zu überprüfen, wurde untersucht, ob geringe pH-Wertänderungen der Kontrastierungslösungen, wie sie bei normaler Lagerung auftreten, die Darstellung wesentlich beeinflussen können. Zu diesem Zwecke wurden von Phosphorwolframsäure und Ammoniummolybdat je eine Lösung mit dem pH-Wert 6,0 und 8,0 hergestellt. Auf Uranylacetat wurde verzichtet, da hierbei pH-Wert-Änderungen ohne EDTA-Zusatz zur Ausfällung führen, die Lösung mit Zusatz aber nur sehr begrenzt haltbar ist. Im übrigen

sprechen unsere oben dargestellten schlechten Ergebnisse ohnehin gegen eine Anwendung von Uranylacetat bei der Schnelldiagnostik. Die Versuche wurden mit Hilfe der Sukzessivtechnik durchgeführt.

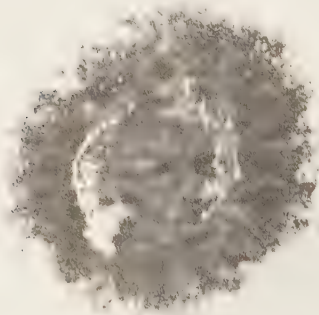
Phosphorwolframsäure vom pH 6,0 lieferte etwa die gleichen Ergebnisse wie mit neutralem pH-Wert, so daß eine geringe Verschiebung in den sauren Bereich toleriert werden kann (Abb. 11).



11

Abb. 11: Zostervirus, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure bei pH 6,0 (180 000 : 1).

Deutlich schlechter aber wurden die Resultate bei einem pH-Wert von 8,0. Es war erkennbar, daß die Viren hier von der Lösung angegriffen werden und die saubere Darstellung verloren geht (Abb. 12 a). In vielen Fällen war zu beobachten, daß das Kapsid teilweise oder ganz zerstört war und dadurch der Innenkörper (Core) allein dargestellt wurde (Abb. 12b,c).



12 a

Abb. 12a: Zostervirus, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure bei pH 8,0, das Kapsid ist teilweise zerstört (180 000 : 1).

Auffällig sind weiterhin die geringe Auflösung und häufig eine starke Deformation des Kapsids.

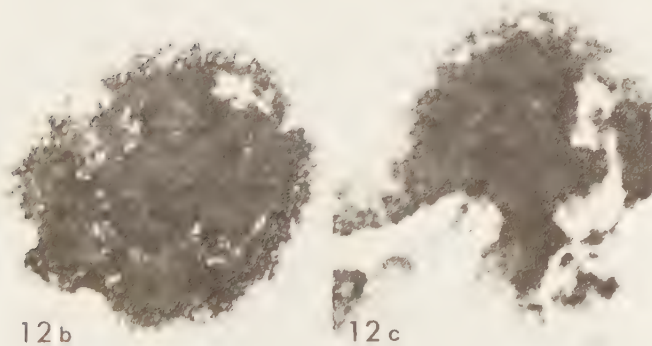


Abb. 12b: Zostervirus, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure bei pH 8,0, das Kapsid ist fast vollständig aufgelöst (180 000 : 1).

Abb. 12c: Zostervirus, kontrastiert mit Phosphorwolframsäure bei pH 8,0, das Kapsid ist aufgelöst, der Innenkörper (Core) allein dargestellt (180 000 : 1).

2. Haltbarkeit der Kontrastierungslösungen

Um die Haltbarkeit der Schwermetallverbindungen zu testen, wurden je 4 Lösungen von Phosphorwolframsäure und Ammoniummolybdat hergestellt, 2 Lösungen von Uranylacetat. Phosphorwolframsäure und Ammoniummolybdat wurden auf neutralen pH-Wert eingestellt. Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, je eine Lösung im Kühlschrank bei etwa + 4° Celsius. Uranylacetatlösungen wurden grundsätzlich im Dunkeln aufbewahrt, da sie sich unter Lichteinwirkung zersetzen. Auch alle anderen Lösungen wurden in braunen Flaschen aufbewahrt, waren aber dem Licht ausgesetzt.

Phosphorwolframsäure zeigte in den ersten Wochen nur geringe Abweichung vom neutralen pH-Wert, erst nach 3 Monaten war ein Abfall von pH 7,0 auf pH 6,7 nachweisbar. Nach weiteren 3 Monaten sanken die Werte auf etwa pH 6,4 und wiederum nach 3 Monaten auf pH 6,2. Dieser pH-Wert wurde auch bei noch längerer Lagerung kaum unterschritten, bei ein Jahr alten Lösungen sank der pH-Wert nie unter 6,0. Ausfällung stellt sich bei Phosphorwolframsäure nach etwa 6 Wochen ein, während gekühlte Lösung zu diesem Zeitpunkt noch frei von Trübungen war. Ammoniummolybdat zeigte in den ersten Wochen größeren pH-Abfall als Phosphorwolframsäure, sank aber auch nach längerer Zeit nicht unter pH 6,0. Nach 3 Monaten war ein Ab-

fall auf pH 6,4 festzustellen, nach 6 Monaten auf pH 6,0 oder etwas darüber. Über einen längeren Zeitraum wurde die Lösung nicht aufbewahrt. Im Vergleich mit Phosphorwolframsäure fiel Ammoniummolybdat etwas schneller aus, auch hier hielt sich die gekühlte Lösung besser. Der pH-Wert von Uranylacetat blieb konstant bei 4,2, was auch zu erwarten war, da dies der Wert der ungepufferten wässrigen Lösung ist. Uranylacetat zeigte als einzige Kontrastierlösung in gekühlter und ungekühlter Form keine Ausfällung von Salzkristallen.

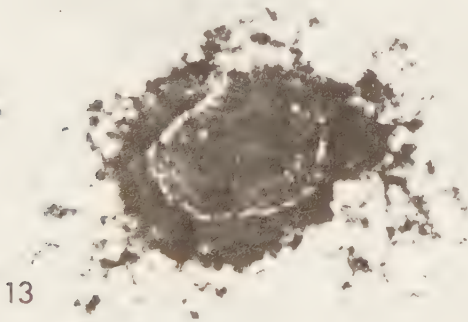


Abb. 13: Zostervirus, kontrastiert mit 4 Monate alter Phosphorwolframsäurelösung (180 000 : 1).

Bei der Kontrastierung mit diesen alten Lösungen zeigte es sich, daß sie etwa 6 - 8 Wochen ihre volle Wirkung beibehalten, dann langsam schlechter kontrastieren, aber auch noch nach verhältnismäßig langer Zeit Abbildungen liefern (Abb. 13,14). So konnte mit einer ein Jahr alten Phosphorwolframssäurelösung noch kontrastiert werden, mit Ammoniummolybdat etwa 6 Monate. Man sollte alte Lösungen vorher nicht aufschütteln, da sonst zahlreiche Kristallnadeln zur Darstellung kommen und das Bild unbrauchbar machen.

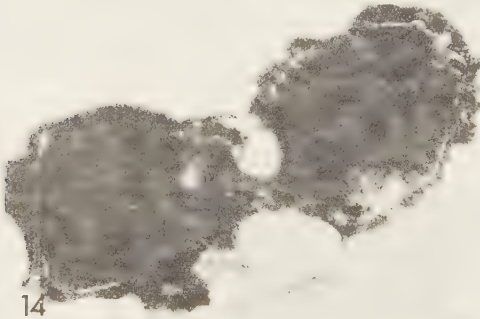


Abb. 14: Zosterviren, kontrastiert mit ein Jahr alter Phosphorwolframsäurelösung (180 000 : 1).

Wenn man aber die Flüssigkeit mit einer Pipette von der Oberfläche absaugt, kann sie ohne Verunreinigungen abgenommen werden. Mit alter Uranylacetatlösung waren fast nie gute Virusdarstellungen zu erzielen.

3. Haltbarkeit des Untersuchungsmaterials

Um die Haltbarkeit des entnommenen Materials zu prüfen, wurden eingetrocknete Materialproben bis zu 8 Wochen aufbewahrt, bevor sie kontrastiert wurden.

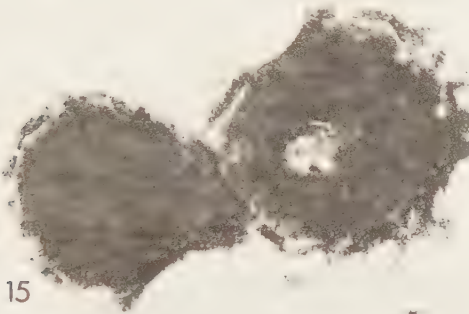


Abb. 15: Pesterviren, kontrastiert nach 4 Wochen Lagerung mit ein Jahr alter Phosphorwolframsäurelösung (180 000 : 1).

Es zeigte sich, daß unfixiertes Material bis zu 4 Wochen haltbar ist, die Viren aber zunehmend schlechter abgebildet werden (Abb. 15). Es wurde weiter beobachtet, daß einmal aufgerührtes Material nach dem Eintrocknen fast nie nochmals verwendungsfähig ist. Ein mehrmaliges Aufrühren mit zwischenzeitlichem Eintrocknen der Suspension ist nicht möglich. Virusmaterial kann also mit der Post zur Untersuchung verschickt werden, der

Zeitraum bis zur Verarbeitung sollte aber so gering als möglich gehalten werden. Die mögliche Infektiosität des Materials ist zu beachten.

4. Haltbarkeit des Materials in kontrastiertem Zustand

Alte Objektträger wurden nochmals untersucht und fotografiert, um zu prüfen, wie lange negativkontrastierte Virusteilchen noch später im Präparat erkennbar sind. Wir konnten dazu auf Material zurückgreifen, das mehr als zwei Jahre alt war.

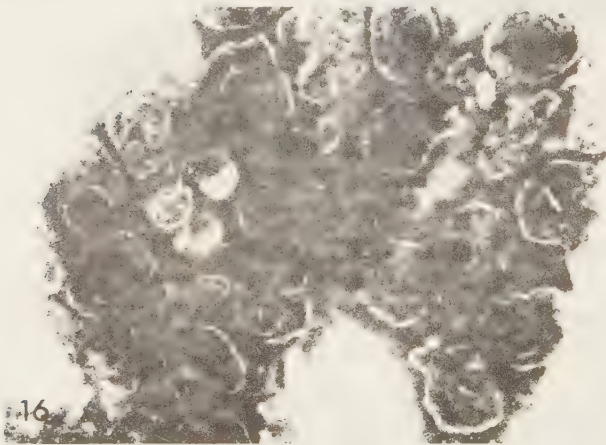
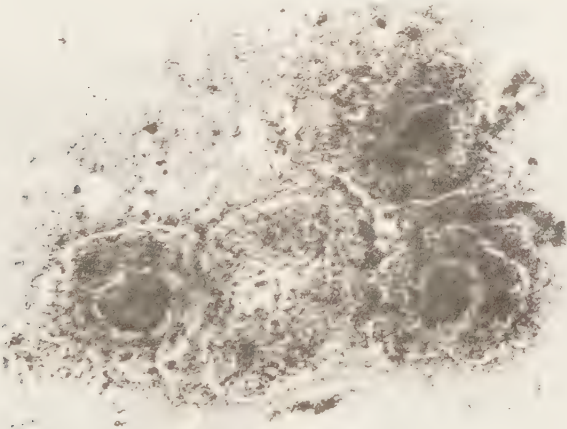


Abb. 16: Herpes-simplex-Viren, Aufnahme eines
2 Jahre alten Präparates (90 000 : 1).

Die Untersuchungen zeigten, daß zum Teil sehr gute Aufnahmen von alten Objektträgern möglich sind, selbst wenn das Material 2 Jahre alt ist (Abb. 16). Es gab aber auch Fälle, in denen nach dieser Zeit kein Nachweis mehr möglich war, obwohl der Befund ursprünglich positiv gewesen war. Einige Bilder sprechen dafür, daß es im Laufe der Zeit zur Zersetzung der Viren kommen kann. In diesen Fällen zeigte das ursprünglich kontrastreiche Bild abgeschwächte Darstellung und Verlust des Kontrastes (Abb. 17).



17

Abb. 17: Zosterviren, Aufnahme eines 8 Monate alten Präparates, beginnende Zersetzung (90 000 : 1).

V. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Diagnostik

1. Patientengut

Für die Untersuchung wurden 97 Patienten beiderlei Geschlechts herangezogen. Es handelte sich um folgende klinische (Verdachts-)Diagnosen:

Herpes simplex, Varizellen-Zoster, Vaccinia inoculata, Molluscum contagiosum, Ecthyma contagiosum (Orf), habituelle Aphthen und fragliche "Virusexantheme".

2. Morphologie der Viren im Negativkontrast

a) Herpesvirusgruppe

Zu dieser Gruppe der meist rundlichen bis ovalen Viren zählt das Herpes-simplex und das Varizellen-Zoster-virus (Abb. 18-21). Eine morphologische Unterscheidung dieser beiden Virusarten ist in der Praxis nicht möglich, obwohl das Varizellen-Zostervirus nach Literaturangaben (71,54,19,39,76) geringfügig größer sein soll. Im Negativkontrast erkennt man einen zentral gelegenen runden Innenkörper, der als Nukleokapsid bezeichnet wird. Er besteht aus dem DNS-haltigen Nukleoid und dem ihn einhüllenden Kapsid. Das Kapsid besteht aus zahlreichen Untereinheiten, den Kapsomeren, die den Innenkörper strahlenkranzförmig umgeben und ihm eine regelmäßige Oberflächenstruktur verleihen. Das Nukleoid kann im Negativkontrast hell oder dunkel

erscheinen, je nachdem, ob es DNS enthält oder "leer" ist. Meist ist das Nukleokapsid von einer äußeren Hülle umgeben, die rundlich oder unregelmäßig erscheint. Mehrere Nukleokapside können eine gemeinsame Hülle besitzen. Der Durchmesser des Nukleokapsids beträgt bei Herpesviren ca. 110 nm, der mittlere Gesamtdurchmesser einschließlich Hülle ca. 180 nm, während der Gesamtdurchmesser bei Varizellen-Zosterviren ca. 200 nm beträgt (2,21,80).

Herpesvirusgruppe:

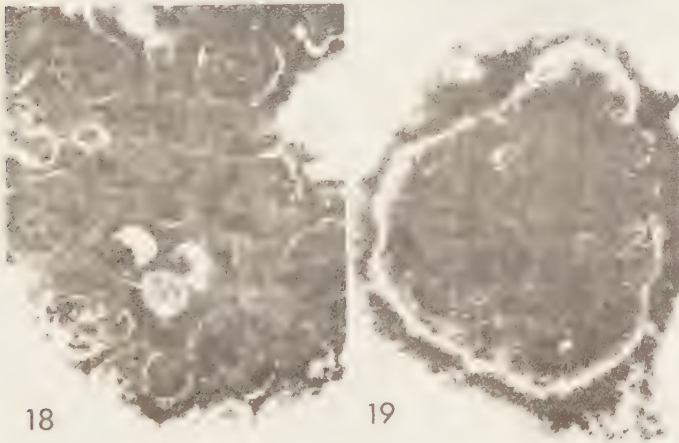
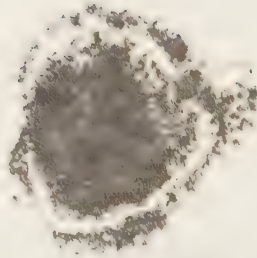


Abb. 18: Herpesviren, Übersicht (90 000 : 1).

Abb. 19: Herpesvirus, 3 Nukleide in einem Kapsid
(180 000 : 1).



20



21

Abb. 20: Zosterviren, Doppeldarstellung (180 000 : 1).

Abb. 21: Zostervirus (180 000 : 1).

b) Pockenvirusgruppe

Die eigenen Untersuchungen umfassen *Vaccinia inoculata*, *Molluscum contagiosum* und *Ecthyra contagiosum*. Morphologisch handelt es sich um Quaderviren, die im Negativkontrast nach Form, Größe und Oberflächenstruktur unterschieden werden können.

Das Vaccinia-Virus erscheint je nach Lagerung im Ausstrich in einer Größe von 200 bis 250 x 270 bis 320 nm. Es können zwei verschiedene Darstellungsformen unterschieden werden (19,51,61). Bei Typ I stellt sich die Oberfläche feinhöckrig in der sogenannten Maulbeerform dar, bei Typ II ist eine scharf begrenzte, eng anliegende Hülle erkennbar (Abb. 22,23).

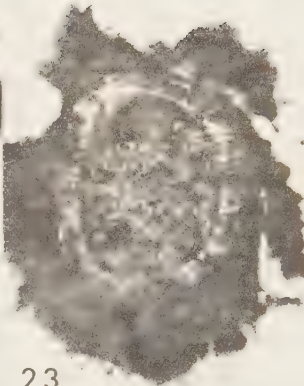
Das Molluscum-contagiosum-Virus ist das größte Virus dieser Gruppe und mißt ca. 210 bis 280 x 300 bis 320 nm. Die Oberfläche zeigt unregelmäßig angeordnete, länglich erscheinende Filamente, die an ein "Garnknäuel" erinnern (80). Insgesamt ist die morphologische Unterscheidung zwischen *Molluscum-contagiosum*- und *Vaccinia*-Viren schwierig (Abb. 24,25).

Das Orf- (*Ecthyra-contagiosum*)-Virus ist von mehr ovaler Form, seine Größe beträgt ca. 160 x 260 nm (19,51,52). Die Oberfläche zeigt ein charakteristisches, relativ regelmäßiges, "kreuz und quer gewebtes" Muster, das durch Überlagerung von schraubenförmig gewundenen Filamenten oder Röhren entstehen soll (Abb. 26,27).

Pockenvirusgruppe:



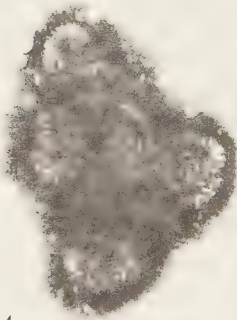
22



23

Abb. 22: Vaccineviren, sog. Maulbeerform (90 000 : 1).

Abb. 23: Vaccinevirus, Darstellung der Hülle (180 000 : 1).



24



25

Abb. 24: Molluscum-contagiosum-Viren, sog. Maulbeerform (90 000 : 1).

Abb. 25: Molluscum-contagiosum-Virus, Darstellung der Hülle (180 000 : 1).

Pockenvirusgruppe:

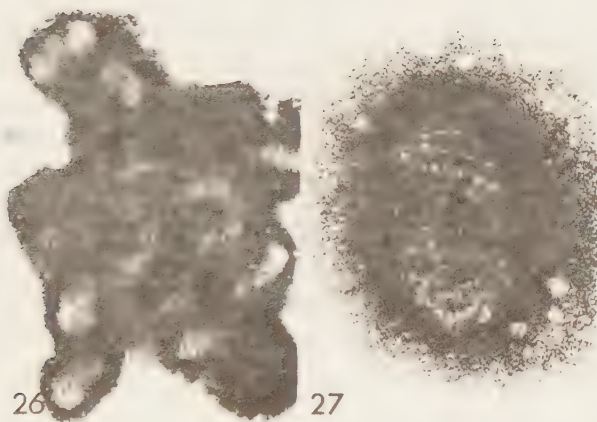


Abb. 26: Ecthyma-contagiosum-Viren, Übersicht
(90 000 : 1).

Abb. 27: Ecthyma-contagiosum-Virus, Einzeldar-
stellung, "kreuz und quer gewebtes"
Muster (180 000 : 1).

3. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Diagnostik

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zur Diagnostik sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Ergebnisse der eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Klinische Diagnose	Gesamt	positiv	negativ
Zoster	43	34	9
Herpes simplex	26	20	6
Varizellen	4	4	-
Vaccinia inoculata	2	2	-
Mollusca contagiosa	3	3	-
Ecthyma contagiosum (Orf)	4	4	-
Habituelle Aphthen	11	-	11
z.B. "Virusexanthem"	4	-	4
Gesamtzahl	97		

4. Diskussion der Ergebnisse

Aus der Tabelle geht hervor, daß - bei allerdings kleinen Patientenzahlen - Varizellen, Vaccinia, Mollusca contagiosa und Ecthyma contagiosum (Orf) in allen untersuchten Fällen einen positiven Virusnachweis ergaben. Bei habituellen Aphthen war das Ergebnis erwartungsgemäß stets negativ, da es sich hierbei offenbar nicht um eine (Herpes-)Viruserkrankung handelt. Bei Zoster und Herpes simplex waren Viren in frischen Effloreszenzen fast stets nachweisbar, dabei oft in sehr großer Zahl. Unsere negativen Befunde stammen von älteren, eingetrockneten oder erodierten Bläschen, die nicht mehr zur elektronenmikroskopischen Diagnostik geeignet sind.

5. Wie lange sind Viren im Verlauf der Erkrankung nachzuweisen?

Von sechs stationär aufgenommenen Zoster-Patienten wurden täglich Ausstriche angefertigt, um zu prüfen, wie lange nach Krankheitsbeginn Viren mit Hilfe des Negativkontrastverfahrens nachzuweisen sind.

Bei Patienten mit frischem Zoster, deren Effloreszenzen aus Bläschen mit wasserhellem dünnflüssigem Sekret bestehen, sind Viren fast immer nachzuweisen, meist in sehr großer Zahl. Im Verlauf der Erkrankung wird der

Bläscheninhalt dickflüssiger, in den letzten Tagen der Abheilung gelblich-eitrig. Solange flüssiges Material aus den Bläschen zu entnehmen war, meist 7 - 10 Tage lang, konnten Viren mit dem Negativkontrastverfahren nachgewiesen werden. Dickflüssiges, eitriges Sekret ist allerdings wesentlich schlechter zur Diagnostik geeignet. Da nur noch wenige Viren im Bläscheninhalt vorkommen, müssen die Präparate oft längere Zeit durchmustert werden, bis typische Virus-
teilchen gefunden werden. Bestehen in den weitgehend abgeheilten Läsionen nur noch Krusten, so war in dem zerriebenen und aufgeschwemmten Material ein Virusnachweis nicht mehr möglich.

VI. Zusammenfassung

1. Die Sukzessiv- und Simultantechnik des Negativkontrastverfahrens für den elektronenmikroskopischen Erregernachweis bei virusbedingten Hautkrankheiten werden verglichen. Beide Methoden sind technisch einfach und schnell. Die Sukzessivtechnik ist in der Handhabung angenehmer, da Virussuspension und Kontrastierungslösung nicht zu gleichen Teilen vermischt werden müssen. Sie ist deshalb für die Routinediagnostik besser geeignet. Unter den geprüften Kontrastierungslösungen zeigte Phosphorwolframsäure in Verbindung mit der Sukzessivtechnik die besten Ergebnisse. Die Ammoniummolybdatkontrastierung ergab in der Simultantechnik gute Resultate, doch ist die Bildqualität schlechter als bei Phosphorwolframsäurekontrastierung. Uranylacetat ist für die Routinediagnostik ungeeignet. Die Dauer der Kontrastierung sollte bei Phosphorwolframsäure 1 Minute, bei Ammoniummolybdat 2 - 3 Minuten betragen. Die Lösungen zeigen die besten Ergebnisse bei neutralem pH-Wert, Abweichungen um eine Stufe ergeben nur unwesentliche Bildverschlechterung.

2. Die Kontrastierungslösungen sind ohne Ausfällungen circa 6 - 8 Wochen haltbar, liefern aber bis zu einem halben Jahr noch eine Kontrastierung, wenn auch von schlechterer Qualität. Die Lösungen sollten im Kühlschrank aufbewahrt werden, da die Haltbarkeit dadurch verlängert wird.

3. Entnommenes Untersuchungsmaterial ist eingetrocknet etwa 4 Wochen haltbar und kann somit verschickt werden. Einmal aufgeschwemmtes Material sollte nicht noch einmal verwendet werden, da der Befund fast stets negativ ist.

4. Auf dem Objektträger kontrastiertes Material ist sehr lange haltbar. Die Bildqualität verschlechtert sich dadurch nur unwesentlich.

5. Es wurden 97 Patienten mit Verdacht auf Viruserkrankungen der Haut elektronenmikroskopisch mit dem Negativkontrastverfahren untersucht. Die klinischen Diagnosen lauteten: Herpes simplex, Zoster, Varizellen, Vaccinia inoculata, Molluscum contagiosum, Ecthyma contagiosum (Orf), Habituelle Aphthen und fragliche "Virusexantheme". Dabei ergaben Varizellen, Vaccinia inoculata, Mollusca contagiosa und Ecthyma contagiosum in allen Fällen einen positiven Virusnachweis. Zoster- und Herpes-simplex-Viren waren in frischen Bläschen fast stets nachweisbar, negative Diagnosen ergaben sich meist bei älteren, eingetrockneten oder erodierten Bläschen. Diese sind zur elektronenmikroskopischen Diagnostik weniger geeignet. Immer negativ war das Ergebnis bei habituellen Aphthen.

6. Die für die Routinediagnostik wichtige Morphologie der Viren im Negativkontrast wird beschrieben und in Bildbeispielen dargestellt.

7. Bei 6 Fällen von klinisch behandeltem Zoster wurde der Virusnachweis täglich im Verlauf durchgeführt. Viren sind etwa 7 - 10 Tage nach Krankheitsbeginn, allerdings zunehmend spärlicher, bis zur völligen Eintrocknung der Bläschen nachweisbar.

VII. Literaturverzeichnis

1. ALMEIDA, J.D., HOWATSON, A.F.:
A negative staining method for cell associated virus.
J. Cell Biol. 16, 616-620 (1963).
2. ALMEIDA, J.D., HOWATSON, A.F., WILLIAMS, M.G.:
Morphologie of varicella (chickenpox) virus.
Virology 16 p. 353 - 355 (1962).
3. ANDERER, F.A., SCHLUMBERGER, H.D., KOCH, M.A.,
FRANK, H. a. EGGERS, H.J.:
Structure of Simian Virus 40. II. Symmetry and
components of the virus particle.
Virology 32, 511 (1967).
4. BERNHARD, W. a. LEDUC, E.H.:
Ultrathin frozen sections. I. Methods and ultra-
structural preservation.
J. Cell Biol., 34, 757 (1967).
5. BESWICK, T.S.L.:
Experimental herpes simplex infection in the
babymouse.
J. Path. Bact. 76, 133 (1958).
6. BESWICK, T.S.L.:
Further observation on experimental herpes simplex
infection in the babymouse.
J. Path. Bact. (Edinb.) 79, 69-76 (1960).

7. BLUMBERGER, K.I.:
Serumeiweißveränderungen beim Q-Fieber.
Münch. med. Wschr. 620 (1955).
8. BRADLEY, D.E.:
A study of the Negative Staining Process.
J. gen. Microbiol. 29, 503-516 (1962).
9. BRENNER, S., HORNE, R.W.:
A negative staining method for high resolution
electron microscopy of viruses.
Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110 (1959).
10. BUCKMIRE, F.L.A., a. MURRAY, R.G.E.:
Studies on the cell wall of *Spirillum serpens*.
I. Isolation and partial purification of the
outermost cell wall layer.
Can. J. Microbiol., 16, 1011 (1970).
11. BURGE, R.C., and SMITH, G.H.:
A new calculation of electr. scattering cross
sections and a theor. discussion of image contrast
in the electr. micr..
Proc. Phys. Soc. 79, 673 (1962).
12. COHEN, A.L. GARNER, G.E. a. LUND, J.:
Zirconium and hafnium compounds as elektron stains.
J. appl. Physiol., 37, 3921 (1966).

13. COONS, A.H.; CREECH, H.J., JONES, R.N.:
Immunological properties of an antibody containing
a fluorescent group.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 47, 200-202 (1941).
14. DALES, S.:
An electron microscope study of the early association between two mammalian viruses and their hosts.
J. Cell Biol. 13, 303-320 (1962).
15. DAWSON jr., J.R.:
Herpetic infection of chorioallantoic membrane of chick embryo.
Amer. J. Path. 9,1 (1933).
16. FINCH, J.T., KLUG, A. a. LEBERMANN, R.:
The structures of turnip crinkle and tomato bushy stunt viruses. II. The surface structure: dimer clustering patterns.
J. Mol. Biol. 50, 215 (1970).
17. GOETZ, O., Wolff, H.H., Peller, P.:
Vaccinia translata mit ungewöhnlicher Lokalisation.
Klin. Pädiat. 186, 489-491 (1974).
18. GRÜTER, W.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen über den sogenannten Herpes corneae.
Ber. dtsch. ophthal. Gesch. 42, 162 (1921).

19. HAAGEN, E.:
Viruskrankheiten des Menschen, Bd. 2.
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1969).
20. HALL, C.E.:
Electron densitometry of stained virus particles.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 1-12 (1955).
21. HERZBERG, K., KLEINSCHMIDT, A.K., LANG, D.,
REUSS, K., DAHN, R.:
Über die Struktur des Zoster-Virus und eine weitere Darstellungsmöglichkeit seiner Capsomeren
Zbl. Bact. I Abt. Orig. 189, 1-13 (1963a)
22. HERZBERG, K., KLEINSCHMIDT, A.K., LANG, D.,
REUSS, K., DAHN, R.:
Vergleichende Virusdarstellung mit Phosphorwolframsäure.
Zbl. Bact. I Abt. Orig. 188, 440-447 (1963).
23. HINZE, H.C., and WALKER, D.L.:
Variation of herpes simplex virus in persistently infected tissue cultures.
J. Bact. 82, 498 (1961).
24. HORNE, R.W., and BRENNER, S.:
A negative staining techn. for high resolution of virus.
IV Internat. Kongr. EM Berlin, Bd. II, 625 (1958).

25. HUXLEY, H.E.:
Some observations on the structure of TMV.
Proc. 1st European Conf. Electron Microscopy,
Stockholm. Almquist and Wiksell, Stockholm p. 260
(1956).
26. INOUE, S., HARDY, J.P.:
Fine structure of the fertilization membranes
of sea urchin embryos.
Exp. Cell. Res. 68, 259 (1971).
27. JOHNSON, M.W., HORNE, R.W.:
Some observations on the relative dehydration
rates of negative stains and biological objects.
J. Microscopy 91, 197 (1970).
28. KAPLAN, A.S.:
A study of herpes simplex virus-rabbit kidney
cell system by the plaque technique.
Virology 4, 435 (1957).
29. KIENING, E., BRAUN-FALCO, O.:
Dermatologie und Venerologie, 2. Auflage.
J.F. Lehmanns Verlag München (1969).
30. KLEINSCHMIDT, A.K.:
Electron microscopic studies of macromolecules
with appositional contrast.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 261, 143-149 (1971).

31. KLEINSCHMIDT, A.K., LANG, D., JACHERTS, D.,
ZAHN, R.K.:
Darstellung und Längenmessungen des gesamten De-
soxyribonukleinsäure-Inhalts von T₂-Bakteriophagen.
Biochem. Biophys. Acta 61, 857 (1962).
32. KLUG, A., BERGER, J.E.:
An optical method for the analysis of Periodicities
in electron micrographs, and some observations on
the mechanism of negative staining.
J. Mol. Biol. 10, 565-569 (1964).
33. LEBERMAN, R.:
Use of Uranyl Formate as a Negative Stain.
J. Mol. Biol. 13, 606 (1965).
34. LIPPELT, H.:
Spezielle Fragen zur Rickettsien-Serologie.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 157, 29 (1951).
35. LIPPELT, H.:
Über die Fortschritte der serologischen
Virusdiagnostik.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 170, 51 (1957).
36. LIPPELT, H., NOGALSKI, J.:
Technik und Grundlagen der Kälteagglutination.
Klin. Wschr. 27, 196 (1949).

37. LIPPERT, W.:
Bemerkungen zum Kontrast beim "negative staining"
der Elektronenmikroskopie.
Die Naturwissenschaften 408 (1964).
38. LIPSCHÜTZ, B.:
Die Einschlussbildungen der Haut.
In Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten
von J. Jadassohn, Bd. II, Berlin (1932).
39. LUTENER, M.A.:
Virus diseases.
In Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin
(A.S. Zelikson, Ed.), p. 365-387, Philadelphia:
Lea & Febiger (1967).
40. MARGHESCU, S., WOLFF, H.H.:
Untersuchungsverfahren in Dermatologie und
Venerologie.
J.F. Bergmann-Verlag, München (1975).
41. MELLEMA, J.E., Van BRUGGEN, E.F.J., GRUBER, M.:
Uranyl oxalate as a negative stain for electron
microscopy of proteins.
Biochem. Biophys. Acta 140, 180-182 (1967).
42. MELNICK, J.L., BANKER, D.D.:
Isolation of B-Virus (Herpes Group) from the
central nervous system of a rhesus monkey.
J. exp. Med. 100, 181 (1954).

43. MIYAMOTO, K.:
Mechanism of Intranuclear Crystal Formation of
Herpes Simplex Virus as Revealed by the Negative
Staining of thin sections.
J. Virol. 8, 534-550 (1971).
44. MOORE, D.H., DAVIES, M.C., LEVINE, S., ENGLERT, M.E.:
Correlation of Structure with Infectivity of
Influenza Virus.
Virol. 17, 470-479 (1962).
45. MUELLER, M., KOLLER, T. a. MOOR, H.:
Preparation and use of aluminium films for
high resolution electron microscopy of macromolecules
Proc. VII Int. Congr. Electron Microscopy,
Grenoble, 1, 633 (1970).
46. MÜLLER, G., MEYERHOFF, K.:
Anomalous Contrast in Electron Micrographs
of Negative Stained Specimen.
Nature 201, 590-591 (1964).
47. MÜLLER, G., PETERS, D.:
Substrukturen des Vaccinevirus, dargestellt durch
Negativkontrastierung.
Arch. ges. Virusforschg. 13, 435 (1963).
48. MURRAY, R.G.E., HALL, MYRTLE, M., a. MARAK, J.:
The maturation of cell wall structure during
germination of Bacillus polymyxa spores.
Can. J. Microbiol., 16, 883 (1963).

49. MUSCATELLO, U., GUARRIERO-BOBYLEVA, V.:
Effect of Negative Stains Used in Elektron
Microscopy on Some Biochemical Parameters
of the Mitochondrial Activity.
J. Ultrastruct. Res. 31, 337-348 (1970).
50. MUSCATELLO, U., HORNE, R.W.:
Effect of the Tonicity of Some Negative-Staining
Solutions on the Elementary Structure of Membrane-
Bounded Systems.
J. Ultrastruct. Res. 25, 73-83 (1968).
51. NAGINGTON, J., HORNE, R.W.:
Morphological Studies of Orf and Vaccinia Viruses.
Virology 16, 248-260 (1962).
52. NAGINGTON, J., NEWTON, A.A., HORNE, R.W.:
The structure of orf virus.
Virology 23, 461-472 (1964).
53. NASEMANN, T.:
Die Infektionen durch das Herpes-simplex-Virus.
Fischer-Verlag Jena(1965).
54. NASEMANN, T.:
Viruskrankheiten der Haut, der Schleimhäute
und des Genitales.
Stuttgart: Thieme(1974).

55. NAUCK, E.G.:
Die Varizellen. Der Herpes Zoster.
In: Die Infektionskrankheiten des Menschen und
ihre Erreger, Bd. 2, S. 1273-1278, Hrsg.: A. Grumbach
u. W. Kikuth.
Stuttgart: Georg Thieme (1958).
56. NERMUT, M.V.:
Bacterial surfaces as revealed by negative
staining method.
Proc. III Europ. Reg. Conf. on Electron
Microscopy, Vol.B, 525 (1964).
57. NERMUT, M.V.:
Methods of negative staining. Schimmel, G.,
Vogell, W. (Ed.): In Methodensammlung der
Elektronenmikroskopie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart (1972).
58. NERMUT, M.V.:
Negative Staining of Viruses.
J. Microsc. 96, 351-362 (1972).
59. NERMUT, M.V.:
Ultrastructural Studies With Influenza Viruses.
I. Effect of some Reagents On the Fine Structure
of the Virion.
Acta virologica 14, 185-193 (1970).
60. NERMUT, M.V.:
Fine structure of influenza A2 (Singapore) as
revealed by negative staining, freeze-drying
and freeze-etching.
J. gen. Virol. 10, 37 (1971).

61. NOYES, W.F.:
The Surface Fine Structure of Vaccinia Virus.
Virology 17, 282-287 (1962).
62. PADGETT, F. a. LEVINE, A.S.:
Fine structure of the Rauscher Leukemia virus
as revealed by incubation in snake venom.
Virology 30, 623 (1966).
63. PERRY, V.P., EVANS, V.J., EARLE, W.R.,
HYATT, G.W., BEDELL, W.C.:
Long term tissue culture of human skin.
Amer. J. Hyg. 63, 52 (1956).
64. PETERS, D., MÜLLER, G., GEISTER, R.:
Zur Deutung sogenannter "inkompletter" Formen
bei der Negativkontrastierung von Viren.
Arch. ges. Virusforsch., 12, 437-440 (1962).
65. REIMER, L.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und
Präparationsmethoden. 2. erweiterte Auflage.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1967).
66. RHIM, J.S., SMITH, K.O., MELNICK, J.L.:
Complete and Coreless Forms of Reovirus (Echo 10)
Ratio of Number of Virus Particles to Infective
Units in the one-step Growth Cycle.
Virol. 15, 428-455 (1961).

67. SCHEIFFARTH, F., BERG, G., Frenger, W.:
Neuere Methoden zum Nachweis und zur Lokalisation
von Antikörpern. Unter besonderer Berücksichti-
gung der Kombination von Elektrophorese und se-
rologischem Antikörpernachweis.
Klin. Wschr. 34, 134 (1956).
68. SCHERER, W.F., SYVERTON, J.T.:
The viral range in vitro of a malignant human
epithelial cell (strain HeLa, GEY). I. Multipli-
cation of herpes-simples, pseudorabies and vaccinia
viruses.
Amer. J. Path. 30, 1057 (1954).
69. SCHIMMEL, G., VOGELL, W. (Ed.):
Methodensammlung der Elektronenmikroskopie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H.
Stuttgart (1972).
70. SORRELL, A.H.:
Skin tests in certain virus diseases. Review of
the literature.
N.Y.St.J. Med. 56, 1778 (1956).
71. TAYLOR-ROBINSON, D., CAUNT, A.E.:
Varicella Virus. Wien-New York: Springer (1972).
72. TAYLOR-ROBINSON, D., DOWNIE, A.W.:
Chickenpox and herpes zoster. I. Complement
fixation studies.
Brit. J. exp. Path. 40, 398 (1959).

73. VALENTINE, R.C., HORNE, R.W.:
An Assessment of Negative Staining Technik For
Revealing Ultrastructure. In Interpretation of
Ultrastructure,
ed. R.J.C. Harris 263, New York (1962).
74. VALENTINE, R.C., Shapiro, B.M., STADTMAN, E.R.:
Regulation of glutamine synthetase.XII. Electron
microscopy of the enzyme from Escherichia coli.
Biochem. 7, 2143 (1968).
75. WARREN, J., CATCHINS, E.C.:
General characteristics and viral susceptibility
of bovine embryonic tissue cultures.
Virology 4, 297 (1957).
76. WATSON, D.H.:
Morphology. In: The Herpes viruses (A.S.Kaplan, Ed.)
p. 27-43.
New York London: Academic Press (1973).
77. WELLER, T.H.:
The application of tissue culture methods to the
study of poliomyelitis.
New Engl. J. Med. 249, 186 (1953).
78. WELLER, T.H., COONS, A.H.:
Fluorescent antibody studies with agents of
varicella and herpes zoster propagated in vitro.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 86, 789 (1954).

79. WILDY, P., RUSSEL, W.C., HORNE, R.W.:
The Morphology of Herpes Virus.
Virology 12, 204-222 (1960).
80. WILLIAMS, M.G. ALMEIDA, J.D., HOWATSON, A.F.:
Electron microscope studies on viral skin lesions.
Arch. Derm. (Chic.) 86, 290-297 (1962).
81. WOLANSKI, B.S., FRANCKI, R.J.B.:
Structure of Lettuce Necrotic Yellows Virus
II. Electron Microscopic Studies on the Effect
of pH of Phosphotungstic Acid Stain on the
Morphology of the Virus.
Virology 34, 437-447 (1969).
82. WOLFF, H.H.:
Eczema herpeticatum, Eczema vaccinatum,
"Eczema verrucatum", "Eczema molluscatum".
Hautarzt 27 (1976, im Druck).

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.Doiz.Dr.med.H.Wolff, für die freundliche Überlassung des Themas und die unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frl. Elfriede Januschke für die ausgezeichnete technische Arbeit und hilfreiche Assistenz.

VIII. Lebenslauf

Am 21. März 1947 wurde ich, Helmuth Gräser, als Sohn des Kaufmanns Hellmuth Gräser und seiner Frau Paula Gräser, geb. Käser, in Landshut geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1953-1958 in München. 1958 trat ich in das Albert-Einstein-Gymnasium in München ein und legte dort am 21. Juli 1967 das Abitur ab.

Anschließend wurde ich zur Bundeswehr eingezogen, wo ich bis 31. März 1969 den Grundwehrdienst ableistete.

Zum Sommersemester 1969 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Studium der Rechtswissenschaften.

Zum Sommersemester 1970 erhielt ich dann die Zulassung für das Fach Zahnmedizin. Am 20. Februar 1973 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung.

Das Staatsexamen für das Studium der Zahnheilkunde beendete ich am 21. Juli 1976.

